

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GUILHERME ALVES FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA VEICULAÇÃO DE
VITAMINA C, AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA,
PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA**

Araraquara – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GUILHERME ALVES FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA VEICULAÇÃO DE
VITAMINA C, AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA,
PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Ferreira, Guilherme Alves

F383d Desenvolvimento de sistemas para veiculação de vitamina C, avaliação da estabilidade química, permeação e retenção cutânea / Guilherme Alves Ferreira. – Araraquara, 2012

94 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hériida Regina Nunes Salgado

Coorientador: Marcos Antonio Corrêa

1. Estabilidade. 2. Ácido ascórbico. 3. Vitamina C. 4. Permeação e retenção cutânea. I. Salgado, Hériida Regina Nunes, orient. II. Correa, Marcos Antonio, coorient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Dedico à minha família, meu pai Lino e minha mãe Rosa, minha irmã Priscila, por estarem sempre ao meu lado e lutando juntos todos os dias. São exemplos para minha vida. Muito obrigado por estarem ao meu lado!

Dedico aos meus avós, Sebastião, Antonia e Dona Maria, por terem iniciado a décadas atrás a construção de nossa família. Muito obrigado!

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, por toda força espiritual que me é concedida todos os dias de minha vida. E por ter permitido que pessoas maravilhosas estejam sempre ao meu lado contribuindo para o meu progresso.

Agradeço ao **Professor Dr. Marcos Antonio Corrêa**, por todo o aprendizado, por todas as conversas, por ter sido além de um grande orientador para este trabalho, foi um grande orientador para a vida. Muito obrigado, por todos esses anos de ensinamentos e compreensão.

Agradeço à **Professora Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**, por ter feito parte deste trabalho e acreditado na realização do mesmo.

Ao **Professor Dr. José Paschoal Batistuti**, por todos os ensinamentos, conversas e uso do laboratório.

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Dra. Leila Ap. Chiavacci, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, Prof. Dr. Marlus Chorilli, por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço em especial à **Caroline Magnani**, pela ajuda, por toda paciência que teve, pela pessoa incrível que foi e é, sem a qual a realização deste trabalho não teria sido possível. Carol, muito obrigado!

Aos amigos do **Laboratório de Cosmetologia**, Bruna Chiari, Ana Paula, Bruna Fatori, Danila, Fernanda, Gabriela, Giovani, Gisele, Hanako, Hannah, Ilza, Jemima, José Ricardo, Letícia, Natália, Paula por toda a amizade, mesmo aqueles que já estavam de saída, quando eu estava chegando.

Aos amigos de outros laboratórios, Flávio Campos, Flávia Chiva, Giovana Calixto, Pri Ferrari, Liliane Pedreiro, Lucas Chiarentin, Juliana Vidigal, Ana Luiza, Hilris Rocha, Fernanda Carbinatto, Gustavo Rossanezi, Eloísa Berbel, Juliana Fernandes.

Em especial à amiga, **Andréia Bagliotti Meneguim**, por todos os cafés da manhã, almoços e jantares, por toda amizade, por toda ajuda, por toda compreensão, por todo companheirismo e companhia, por ser tão engraçada e fazer vários momentos terem sido fantásticos, muito obrigado por tudo. À amiga **Marcia Oyafuso**, por toda amizade, prontidão e alegria.

Aos amigos da **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, Karine Neri, Daniel Garcia, Wagner Fonseca, Túlio.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, em especial aos colaboradores que tornam possível o funcionamento desta faculdade.

À **Seção de Pós-graduação**, em especial à Cláudia, Daniela, Joyce e Márcia, pela atenção e apoio.

"Se enxerguei longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes"

Isaac Newton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	PELE.....	19
2.2	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	20
2.3	VITAMINA C.....	22
2.4	SISTEMAS PARA VEICULAÇÃO DE ATIVOS.....	25
2.5	MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	30
2.6	LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA.....	30
2.7	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA VITAMINA C ...	31
3	OBJETIVO GERAL.....	33
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES.....	35
5.2	EQUIPAMENTOS.....	35
5.3	ACESSÓRIOS E VIDRARIAS.....	36
5.4	MÉTODOS.....	36
5.4.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	36
5.4.2	PREPARO DA EMULSÃO.....	37
5.4.3	PREPARO DAS MICROEMULSÕES E SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS	38
5.4.4	DETERMINAÇÃO DO pH DAS FORMULAÇÕES.....	39
5.4.5	QUANTIFICAÇÃO DO AA.....	39
5.4.6	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO AA ATRAVÉS DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR).....	42
5.4.7	ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.1	PREPARO DOS SISTEMAS.....	50
6.1.1	SOLUÇÕES.....	50
6.1.2	EMULSÕES.....	51
6.1.3	SISTEMAS CONTENDO AGREGADOS SUPRA MOLECULARES.....	52
6.2	QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES PELO MÉTODO DE IODIMETRIA.....	53
6.2.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS SOLUÇÕES NO MESMO DIA PELO MÉTODO DE IODIMETRIA.....	54
6.2.2	QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO POR IODIMETRIA.....	56

6.3	QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES CONTENDO AA UTILIZANDO NBS COMO AGENTE TITULANTE.....	57
6.3.1	COMPARAÇÃO ENTRE AS SOLUÇÕES NO MESMO DIA POR NBS	57
6.3.2	QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO POR NBS	58
6.4	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE AA ATRAVÉS DO MÉTODO DO DPPH.....	59
6.4.1	LINEARIDADE.....	60
6.4.2	EXATIDÃO	62
6.4.3	LIMITE DE DETECÇÃO	63
6.4.4	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	64
6.4.5	PRECISÃO.....	64
6.4.6	REPETIVIDADE OU PRECISÃO INTRA-CORRIDA.....	64
6.4.7	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA OU PRECISÃO INTER-CORRIDAS	65
6.4.8	REPRODUTIBILIDADE	66
6.4.9	ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE	66
6.4.10	ROBUSTEZ.....	67
6.4.11	CURVAS ANALÍTICAS COM SOLVENTES DIFERENTES	67
6.5	QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES CONTENDO AA ATRAVÉS DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR).....	68
6.5.1	QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR).....	70
6.6	ALTERAÇÃO DE COR E DEGRADAÇÃO DE AA.....	71
6.7	SISTEMAS CONTENDO AGREGADOS SUPRA MOLECULARES	72
6.7.1	QUANTIFICAÇÃO PELO MIR	76
6.8	ESTUDO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO....	79
6.8.1	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO AA CONTIDO NA EMULSÃO.....	79
6.8.2	AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO AA CONTIDO NA EMULSÃO.	82
6.8.3	AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO NO ESTRATO CÓRNEO, EPIDERME E DERME DO AA CONTIDO NA EMULSÃO	83
7	CONCLUSÃO	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico	23
Figura 3. Estrutura de mesofase Hexagonal	28
Figura 2. Estrutura de mesofase lamelar	28
Figura 4. Mesofáse liotrópica cúbica.....	29
Figura 5. Representação do diagrama ternário de fases.....	38
Figura 6 Esquema da padronização da solução de iodo e NBS.....	40
Figura 7. Esquema da padronização da solução de tiosulfato de sódio	41
Figura 8. Esquema da iodimetria	41
Figura 9. Esquema da titulação com NBS.....	42
Figura 10. Célula de Franz	47
Figura 11. Reação de oxidação do ácido ascórbico à ácido dehidroascórbico.....	54
Figura 12. Gráfico representando as concentrações de AA em percentagem, presentes nas diferentes soluções binárias – propilenoglicol/água, comparadas no mesmo dia e durante 28 dias, empregando-se a Iodometria como método analítico.....	55
Figura 13. Gráfico representando os resultados quantitativos das concentrações de AA presente na emulsão após 28 dias, aplicando-se a iodometria como método analítico.....	56
Figura 14. Gráfico representando as concentrações de AA em percentagem, presentes nas diferentes soluções binárias – propilenoglicol/água, comparadas no mesmo dia e durante 28 dias, aplicando-se NBS como método analítico.....	57
Figura 15. Gráfico representando os resultados quantitativos das concentrações de AA presente na emulsão após 28 dias, aplicando-se NBS como método analítico.	59
Figura 16. Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método	61
Figura 17. Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método	61
Figura 18. Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método	61
Figura 19. Média das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método	62
Figura 20. Curva analítica para quantificação do AA utilizando metanol como solvente.	68
Figura 21. Curva analítica para quantificação de AA utilizando tampão fosfato (pH=7,4) como solvente.	68
Figura 22. Gráfico comparativo da percentagem de AA presentes nas soluções - propilenoglicol/água no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.	69
Figura 23. Gráfico comparativo das percentagem de AA presentes na emulsão no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.....	71
Figura 24. Foto das soluções logo após a manipulação.....	71
Figura 25. Foto das soluções após 28 dias.....	71

Figura 26. Reação de oxidação não enzimático do AA.....	72
Figura 27. Diagrama de fases com a classificação do sistemas obtidos. Polysorbate 80 (tensoativo), água (fase aquosa) e Dicaprylyl Carbonate (fase oleosa).....	73
Figura 28. Diagrama de fases com classificação das áreas encontradas após avaliação por microscopia de luz polarizada. Polysorbate 80 (tensoativo), água (fase aquosa) e Dicaprylyl Carbonate (fase oleosa). ME=microemulsão; CL=sistema líquido cristalino; EM=emulsão; SF=separação de fases.....	74
Figura 29. Fotomicrografia apresentando cruzes de Malta, característica de fase lamelar ..	75
Figura 30. A fotomicrografia com a presença de estrias, característica de fase hexagonal..	75
Figura 31. Fotomicrografia representativa de formulação do tipo microemulsão com campo escuro.....	76
Figura 32. Gráfico comparativo das percentagem de AA presentes nos sistemas P2, P5 e P15 no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.	77
Figura 33. Gráfico comparativo das percentagens de AA presentes nos sistemas ou formulações P2, P5, P15, comparadas à emulsão (F2) avaliados pelo método analítico MIR.	78
Figura 34. Porcentagem de AA liberado pela emulsão através das membrana sintética nos tempos de 1/2, 1, 2, 4 e 8 horas.....	80
Figura 35. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de zero ordem.	81
Figura 36. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de primeira ordem.	81
Figura 37. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de Higuchi.	81
Figura 38. Concentração em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AA permeada através da membrana biológica, a partir da emulsão, analisadas no período de 8 horas empregando-se como técnica analítica o MIR.	82
Figura 39. Concentração em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AA retido no estrato córneo, epiderme e derme da membrana biológica, a partir da emulsão, analisadas no período de 8 horas empregando-se como técnica analítica o MIR.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções de água e Propileno Glicol nas diferentes soluções de AA.....	37
Tabela 2 Composição percentual da emulsão proposta.....	37
Tabela 3. Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do AA	63
Tabela 4. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AA	63
Tabela 5. Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação de AA	65
Tabela 6. Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do AA	65
Tabela 7. Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do AA	66
Tabela 8. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do AA.....	66
Tabela 9. Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do AA.....	67
Tabela 10. Composição percentual das formulações propostas	72
Tabela 11. Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação da emulsão contendo AA	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Ascórbico

NBS - N- BromoSuccinamide

PG - Propilenoglicol

O/A - Óleo em Água

A/O - Água em Óleo

MIR - Método de Inibição pelo radical DPPH

STBV - Sistema Transparente de Baixa Viscosidade

STVI - Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária

STAV - Sistema Transparente de Alta Viscosidade

SSTBV - Sistema Semi-Transparente de Baixa Viscosidade

SSTVI - Sistema Semi-Transparente de Viscosidade Intermediária

SSTAV - Sistema Semi-Transparente de Alta Viscosidade

SF - Separação de Fases

E - Emulsão

SO - Sistema Opaco

RESUMO

O ácido ascórbico (AA), conhecido como vitamina C, é vital para o funcionamento das células e isso é particularmente evidente no tecido conjuntivo, pois é co-fator de duas enzimas essenciais na biossíntese do colágeno, a lisil e prolil hidroxilase. Aumenta a absorção de ferro e através de sua capacidade antioxidante protege as células e tecidos contra os danos oxidativos provocados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio. No entanto, o AA quando incorporado em sistemas para o uso tópico é instável e por isso, é necessário que seja avaliada a sua estabilidade química. Este trabalho teve como objetivo desenvolver sistemas que auxiliem na estabilidade do AA, e para a avaliação da sua estabilidade química, foram propostos métodos de quantificação aplicados ao longo do tempo. Foram utilizados três métodos para a determinação e quantificação do AA, dois métodos titulométricos, que utilizam o NBS e o IODO como agentes titulantes e o método de inibição do radical DPPH (MIR), todos de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Também foram realizados os ensaios *in vitro* de liberação, permeação e retenção cutânea para avaliar a eficácia do sistema que melhor auxiliou na manutenção da estabilidade química do AA ao longo do tempo. Foram preparados sistemas binários constituídos por propilenoglicol e água, sistemas contendo agregados supramoleculares (microemulsões e sistemas líquido cristalinos) e sistema emulsionado, e todos os sistemas foram adicionados de AA a 1%. Dentre os métodos de escolha o MIR foi validado por ser eficiente na quantificação de todos os sistemas propostos, diferentemente dos métodos titulométricos, que não foram adequados para os sistemas contendo agregados supramoleculares. O AA presente nos sistemas binários e sistemas contendo agregados supra moleculares foi determinado e, estes sistemas mostram-se menos efetivos em relação ao sistema emulsionado O/A, que apresentou maior capacidade de manutenção da estabilidade do AA, com 63,98% de teor do ativo ao longo de 90 dias. Os sistemas binários mostram que a capacidade de manutenção depende da proporção entre água e propilenoglicol sendo o sistema S2 (75% água e 25% propilenoglicol) o que apresentou os melhores resultados. Os sistemas contendo agregados supramoleculares não foram eficientes e, isto pode ser explicado pela sua transparência o que favoreceria a oxidação do AA. O sistema emulsionado contendo AA foi avaliado quanto a liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do ativo, apresentando baixa taxa de liberação, permeação e maior taxa de retenção na pele.

Palavras-Chave: Estabilidade, Ácido ascórbico, Vitamina C, Liberação, Permeação e Retenção Cutânea

ABSTRACT

Ascorbic acid (AA), known as vitamin C is vital to the functioning of cells and this is particularly evident in the tissue, it is a cofactor for two essential enzymes for the biosynthesis of collagen, the lysyl and prolyl hydroxylase. Increases iron absorption and by its antioxidant protects cells and tissues against oxidative damage caused by free radicals and reactive oxygen species. However, when the AA incorporated into systems for topical use is unstable and therefore it must be evaluated their chemical stability. This study aimed to develop systems that aid in the stability of AA, and to evaluate their chemical stability, have been proposed quantification methods applied over time. Three methods were used for the determination and quantification of AA, two titrimetric methods, using NBS and iodine agents as titrants and method of inhibiting the radical DPPH (MIR), all of low cost and easily reproduced. Were also performed in vitro release, permeation and skin retention to evaluate the effectiveness of the system that best helped in maintaining the AA chemical stability over time. Binary systems were prepared consisting of propylene glycol and water system containing supramolecular aggregates (microemulsions and liquid crystalline systems) and emulsified system, in all systems were added 1% of AA. Among the methods of choice has been validated by the MIR to be effective in the quantification of all the systems proposed, unlike titrimetric methods, which are not suitable for systems containing supramolecular aggregates. The AA present in binary systems and systems containing molecular aggregates was determined above, and these systems have been less effective in relation to the emulsified system O/A, which showed greater ability to maintain the stability of AA with 63.98% content active throughout the 90 days. The binary systems show that depends on the capacity maintenance ratio of water and propylene glycol and the system S2 (75% water and 25% propylene glycol) which showed the best results. Systems containing supramolecular aggregates were not efficient and this can be explained by its transparency, which would favor the oxidation of AA. The emulsified system containing AA was evaluated for the release, skin permeation and retention in vitro of the active, has low rates of release, permeation and higher retention rate in the skin.

KeyWords: Stability, Ascorbic Acid, Vitamin C, Skin permeation and retention

1 INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, está envolvido em importantes processos metabólicos do corpo humano, como na formação de hidroxiprolina, hidroxilisina, adrenalina, serotonina, ácido homogentísico e carnitina. Além disso, é co-fator enzimático e participa de processos de oxidorredução, aumentando a absorção de ferro e auxiliando na inativação de radicais livres (PADH, 1991). No entanto, essa vitamina não pode ser sintetizada pelos seres humanos e por isso, necessitam obtê-la por fontes externas (TSUMURA et al, 1993).

Nas últimas décadas, surgiram relatos dos benefícios do uso do AA em cosméticos. O AA, aplicado topicamente é capaz de minimizar a resposta inflamatória da pele quando exposta a luz solar e tem sido usado como clareador cutâneo, inibindo a tirosinase. É essencial para formação das fibras de colágeno na derme. Tem baixo custo em relação a seus derivados existentes no mercado, o que o torna interessante para o uso em produtos de uso tópico, já que estes mesmos derivados tem eficiência questionada, pois, não demonstram atividade maior do que o próprio AA. Ressalta-se que as propriedades do AA em produtos cosméticos não são totalmente conhecidas, sendo necessário maior aprofundamento nos estudos para melhor aproveitamento de suas funções em cosméticos (GAREWAL & DIPLOCK, 1995; TSUMURA et al, 1993)

Quando o AA é incorporado em formulações é necessário garantir a sua estabilidade química, bem como estudar a eficácia do produto acabado (MAIA CAMPOS et al., 2000; SILVA et al., 2001; ANVISA, 2001).

Por ser instável, vários derivados foram criados para que se contornasse o problema da rápida oxidação. Em alguns casos, a estabilidade química foi alcançada, mostrando-se efetivos para o uso oral, porém, de pouco valor na melhora das características esperadas por sua aplicação na pele. Outros derivados como, por exemplo, o ascorbil 6-palmitato não foi capaz de atravessar o estrato córneo, o que mostra a necessidade do desenvolvimento de sistemas que auxiliem na manutenção da estabilidade do ácido-L-ascórbico, ou que o disponibilizem em sua forma ativa na pele (WEBER et al., 2009; PINNELL et al., 2001).

As formas de manipulação e processamento, as condições de estocagem e de embalagem, presença de oxigênio, luz, catalisadores metálicos, enzimas e pH

são fatores que podem estar relacionados com a degradação do AA (TANAKA, 2007; ZERDIN et al., 2003).

Devido à grande possibilidade de diversos interferentes influenciarem estabilidade do AA, é necessário o uso de sistemas adequados para a veiculação do mesmo. Dentre as estratégias de veiculação encontram-se os sistemas binários contendo propilenoglicol (PG) e água em diferentes concentrações, as emulsões e os sistemas contendo agregados supra moleculares do tipo microemulsões ou nanoemulsões e os sistemas líquido cristalinos) (HOLEGAARD e MOLLGAARD, 1985).

Estudos sobre a permeação cutânea de fármacos e substâncias ativas de aplicação cosmética são extremamente importantes na elaboração de formas cosméticas/farmacêuticas de liberação dérmica e transdérmica (LEVEQUE et al., 2003). A pele desempenha muitas funções, mas, em relação à permeação cutânea humana, a função mais importante é a de proteção ou barreira (FORSLIND et al., 1997). O local da pele conhecido como “zona barreira” é representada por três distintas camadas, o estrato córneo, a epiderme viável, e a derme, além da rede de capilares sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (CHIEN, 2005).

A denominação permeação percutânea de substâncias, em um sistema transdérmico ou em preparações dermatológicas, representa o caminho que estas substâncias irão percorrer através das camadas da pele até atingirem a corrente sanguínea. Em preparações dermatológicas, embora seja importante que o fármaco ou ativo penetre além da superfície, normalmente não se deseja que os mesmos alcancem a circulação sistêmica (JATO, 1997).

Métodos para determinar a penetração e absorção de substâncias ativas através da pele podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. As vantagens dos métodos *in vitro* sobre os métodos *in vivo* são as possibilidades de se poderem fazer várias replicatas das análises, podem-se administrar várias condições do estudo e, além disso, são de mais fácil realização. Como limitações, existe a dificuldade de obtenção das membranas (usando pele humana), dificuldades na armazenagem, altos custos e a possível variabilidade da permeação e, além disto, as condições da circulação sanguínea podem não ser reproduzidas totalmente, não considera o efeito de possíveis degradações e separações do estrato córneo do resto da epiderme e nem a ocorrência de mudanças fisiológicas e anatômicas,

inevitáveis, devido à ausência da circulação sanguínea (ALLEN et al., 2007; CHIEN, 2005; VENTER et al., 2001).

Para a avaliação das preparações de uso dermatológico, a literatura científica relata o uso de estudos de permeação e retenção cutânea, *in vitro*, utilizando a “célula de difusão ou de Franz” (FRANZ, 1975, 1978). O sistema de difusão de Franz é bastante utilizado devido ao seu baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados e realização em pequeno espaço de tempo, comparativamente a outras técnicas (LEVEQUE et al., 2003).

São usadas para os testes de permeação cutânea peles de porco devido à sua similaridade com a pele humana em termos de morfologia e características de permeabilidade (características morfológicas e funcionais semelhantes à pele humana) (OECD, 2004). As fibras elásticas na derme, as enzimas presentes na epiderme, o tempo de *turnover* do tecido epidermal, as proteínas queratínicas e a espessura da epiderme da pele de porco são características de similaridade com a pele humana, havendo diferenças, no entanto, em relação à constituição do tecido gorduroso e na vascularização das glândulas cutâneas.

A determinação quantitativa do AA em formulações tem sido um problema para indústrias cosméticas e o setor magistral, já que testes quantitativos são exigidos apenas em lotes piloto, no caso das indústrias de cosméticos, ou seja, métodos de baixo custo podem ser alternativos para que a determinação quantitativa de substâncias como o AA passem a ocorrer em todos os lotes de produção. Essa necessidade despertou interesse em estudos de novas metodologias, que sejam mais específicas, sensíveis e exatas. Diante de tantas variáveis interferentes durante o processo de manipulação, armazenamento e consumo de produtos contendo AA, torna-se necessário o domínio de técnicas específicas para sua determinação nos sistemas em que for veiculado, além de permitir avaliar a permeação e retenção cutânea *in vitro* do AA (LORAY, 1999).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é o principal tecido protetor do corpo, uma fronteira ativa entre o organismo e o ambiente. Não somente controla a perda de fluidos, mas também evita a penetração de substâncias estranhas, nocivas, radiações e atua como um amortecedor frente a golpes mecânicos e também regula a perda de calor e transmitem os estímulos que chegam a ela (WELLS et al, 2004). Corresponde a aproximadamente 5,5% da massa corporal, sendo assim considerado o maior órgão do corpo humano. É composta por três camadas de tecidos, a epiderme a derme e a hipoderme (WELLS et al, 2004; GOLDSMITH, 1990; LEONARDI, 2004).

A epiderme é formada por um epitélio pavimentoso estratificado, que é sustentada e nutrida por uma camada espessa e resistente de tecido conjuntivo, denso e fibroelástico, denominado derme (JUNIOR, 2006). É formada por quatro tipos celulares: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merckel (WELLS et al, 2004).

A derme é uma camada muito vascularizada que possui arteríolas e vênulas, por onde circula o sangue e também possui numerosos receptores sensoriais, sendo ligada aos tecidos subjacentes, por uma camada de tecido conjuntivo frouxo, denominada hipoderme, que contém quantidade variável de tecido adiposo (JUNIOR, 2006).

Com o conhecimento da fisiologia da pele ocorreu um maior interesse no uso de vitaminas em preparações cosméticas. As vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis para a manutenção das funções metabólicas dos seres vivos. Atuam em reações bioquímicas como co-fatores enzimáticos (PAOLA et al., 1998)

Para o tratamento de doenças ocasionadas pela falta de vitaminas, e/ou prevenção de sinais de envelhecimento ou ainda para o combate aos radicais livres, as vitaminas podem ser utilizadas como suplementação de uso oral (PAOLA et al., 1998).

Pesquisas com animais e humanos, onde foram avaliadas a penetração tópica das vitaminas, indicaram que é possível obter maiores níveis de concentração de certas vitaminas, como a vitamina c, na pele do que quando administradas por

via oral, podendo exercer, também, determinada ação farmacodinâmica (PAOLA et al., 1998).

Na área cosmética, especificamente, as vitaminas têm despertado grande interesse em função de suas propriedades, regeneradoras de tecidos, antioxidantes e protetora contra os danos causados pelos raios ultravioletas que levam ao envelhecimento cutâneo precoce e o controle na queratinização e melanogênese (MAIA CAMPOS, 2000; PAOLA et al., 1998)

2.2 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

O envelhecimento é um processo complexo que representa um desgaste biológico em nível celular, resultando em diminuição da capacidade de realizar funções normais e na diminuição de renovação celular (YAAR e GILCHREST, 2001). Harman em 1981 definiu o envelhecimento como a perda da funcionalidade e da perda da capacidade de se adaptar ao estresse. Fatores genéticos (intrínsecos) e ambientais (extrínsecos) são responsáveis pelo processo de envelhecimento (HAHHIEW et al., 2000).

Os fatores intrínsecos ocorrem em todos os órgãos e são geneticamente determinados. São espécies-específicos e órgãos-específicos, ocorrendo em diferentes taxas nas diferentes espécies e órgãos (HADSHIEW et al., 2000). Já os fatores extrínsecos são representados principalmente pela exposição à radiação UV que contribui significativamente para o envelhecimento prematuro da pele, pelo cigarro que contém em sua fumaça uma substância química conhecida como benzopireno que atua fortemente no DNA modificando as bases de guanina, pelo uso excessivo de álcool e pela poluição ambiental (carros, indústrias, queimadas, substâncias químicas lançadas no meio ambiente sem controle) (HADSHIEW et al., 2000, TAGAMI, 2008., MENON et al, 2009).

O metabolismo celular normal produz radicais livres e podem ter um aumento em sua produção se expostos aos fatores extrínsecos como a radiação UV. O estresse oxidativo pode levar a vários danos não somente ao DNA genômico, mas também pode reduzir a capacidade respiratória mitocondrial e com o passar dos anos, devido ao efeito cumulativo causa danos ao DNA (HADSHIEW et al., 2000., YAAR e GILCHREST, 2001., MENON et al., 2009).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991,1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). A ocorrência do estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

Ao longo dos anos a pele se torna menos hidratada, eventualmente pigmentada, com rugas finas, sinais de flacidez e aumenta o número de neoplasmas benigno. Outra mudança dérmica é a diminuição das fibras colágenas que torna a pele mais fina. Após a menopausa ocorre uma rápida diminuição dos níveis de colágeno na pele e na massa óssea, sugerindo que o estrógeno influencia na síntese de colágeno tanto na pele quanto na massa óssea (YAAR e GILCHREST, 2001).

Cada vez mais estratégias para que se mantenha a pele mais saudável e com aparência mais jovem, atenuando assim os efeitos do envelhecimento, tem sido sugerido (MENON et al., 2009). A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL et al., 1997).

Segundo a ABIHPEC, 2011, os produtos antienvelhecimento vêm sendo cada vez mais valorizados nos últimos anos, uma tendência que se firma, principalmente para o público a partir dos 30 anos - marco do início do uso destes produtos. Dentre os produtos antienvelhecimento destacam-se aqueles que possuem ativos antioxidantes em sua composição.

2.3 VITAMINA C

A vitamina C foi isolada e caracterizada primeiramente por Szent-Gyorgyi em 1928 (SHAPIRO e SALIOU, 2001). Hirst e Haworth, em 1933, anunciaram a estrutura química da vitamina C e sugeriram, em conjunto com Szent-Gyorgyi, a mudança do nome para ácido ascórbico (AA), por inferência a suas propriedades antiescorbúticas. No mesmo ano de 1933, Reichstein e colaboradores publicam as sínteses do ácido D-ascórbico e L-ascórbico que, ainda hoje formam a base para a produção industrial da vitamina C. Conseguiram, também, comprovar que o ácido L-ascórbico sintetizado possui a mesma atividade biológica da substância natural.

Os seres humanos e outros primatas são os únicos mamíferos incapazes de sintetizar o AA, a partir da glicose, devido à deficiência da L-gulono-g-lactona oxidase, enzima envolvida na síntese do AA. Desta forma, é necessário adquiri-la na dieta alimentar (COLVEN e PINNELL, 1996; PERRICONE, 2001; MAIA et al., 2001; PINNELL et al., 2001; GRIFFITHS e LUNEC, 2001).

Existente em frutas cítricas e em vegetais o AA é o antioxidante mais abundante presente na pele (KELLER e FENSKE, 1998; MAIA et al., 2001; PINNELL et al., 2001; WEBER et al., 2009). Pode através de sua capacidade antioxidante proteger células e tecidos contra os danos oxidativos provocados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), que são responsáveis pelos danos foto oxidativos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (GALLARATE et al., 1999). Considerando-se que a maioria dos sinais de envelhecimento é provocada pela radiação ultravioleta (UV), e por consequência pelos radicais livres, o uso de uma substância antioxidante torna-se uma estratégia atrativa para o aumento da fotoproteção (PINNELL et al., 2001).

A capacidade antioxidante da vitamina C está relacionada com sua estrutura química (figura 1), que devido ao seu pKa 4,25, quando está presente em pH fisiológico torna-se um mono anion, o qual pode doar um elétron para formar o radical ascorbil e, desta forma com um elétron deslocado, pode ser facilmente oxidado e formar o ácido deidroascórbico (DHA). Tal conversão é reversível. Essa capacidade de transformação funciona como um sistema oxidorredutor capaz de transportar hidrogênio nos processos de respiração (WEBER et al., 2009). As estruturas moleculares do AA e da sua forma oxidada, ácido deidroascórbico, são semelhantes à da glicose devido à existência de vários grupos hidroxila (OH)

próximos uns dos outros (Figura 1). A enzima que cataliza a reação de oxidação que origina o DHA a partir do AA é a reductase (Pires, 2008).

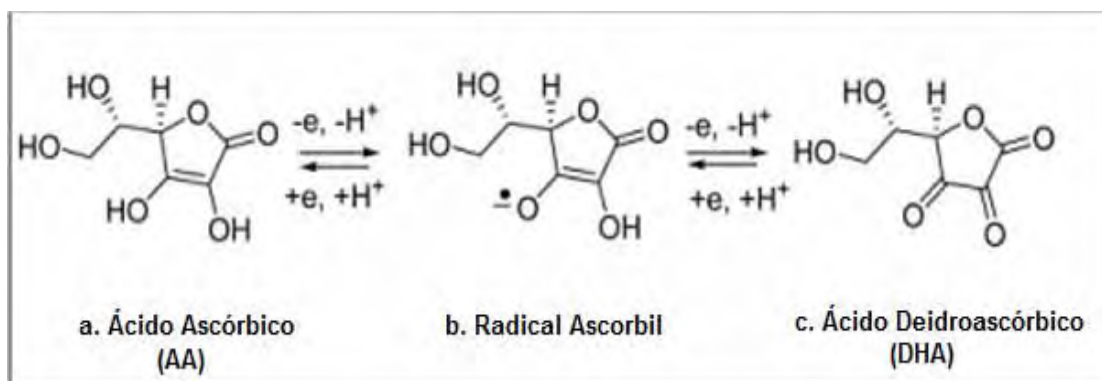


Figura 1. Estrutura química do ácido ascórbico (Pires, 2008)

O ácido L-ascórbico (AA) é vital para o funcionamento das células e isso é particularmente evidente no tecido conjuntivo, durante a formação do colágeno (FENSKE e LOBER, 1986; YAAR e GILCHREST, 1990). Na pele, colágenos tipos I e III contribuem respectivamente com 85% a 90% e 8% a 11% do colágeno total sintetizado (AZULAY et al., 2003). O AA é co-fator para duas enzimas essenciais na biossíntese do colágeno, a lisil e a prolil hidroxilase, duas enzimas férricas que catalisam a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos colágenos, e essas modificações pós-translacionais permitem a formação e estabilização do colágeno de tripla hélice e sua subsequente secreção no espaço extracelular como pró-colágeno (PINNEL et al., 1987). O pró-colágeno é então transformado em tropocolágeno e, finalmente fibras colágenas são formadas por um rearranjo espacial espontâneo das moléculas tropocolágenas (CHAN et al., 1990). Conseqüentemente, a hidroxilação é uma fase crítica na biossíntese de colágeno, uma vez que regula a formação da tripla hélice, da excreção do pró-colágeno e do *cross-linking* do tropocolágeno. A vitamina C, como co-fator, previne a oxidação do ferro e, portanto, protege as enzimas contra a auto-inativação (BOYERA et al., 1998). Dessa forma, promove a síntese de uma trama colágena madura e normal por meio da perfeita manutenção da atividade das enzimas lisil e propil hidroxilases. Além de atuar como importante co-fator para as enzimas já citadas tem sido demonstrado que a vitamina C regula também a síntese de colágeno tipo I e III,

pelos fibroblastos dérmicos humanos. A eficiência do AA também se estende aos antioxidantes lipofílicos como a vitamina E, que mesmo oxidada pode ser regenerada pelo AA (PINNELL et al., 2001)

Em 1994, Phillips e colaboradores demonstraram que, embora a capacidade proliferativa e a síntese de colágeno sejam idade-dependentes, o ácido ascórbico é capaz de estimular a proliferação celular, bem como a síntese de colágeno pelos fibroblastos dérmicos, independente da idade do paciente.

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, no entanto oxida-se rapidamente quando sua solução é exposta ao ar e, devido a essa instabilidade, vários derivados foram criados para que se conseguisse uma maior estabilidade para o uso tópico (WEBER et al., 2009).

A importância de tal afirmação encontra-se amparado pela Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC) que exige além de testes de eficácia e segurança devidamente comprovados, que sua estabilidade química esteja dentro de limites compatíveis com as finalidades de uso (ANVISA, 2001)

Em alguns casos a estabilidade química do AA foi alcançada através de seus derivados, porém, os resultados de melhora da pele nem sempre foi alcançado. Isso se deve ao fato de inúmeras variáveis, dentre elas o pH, a massa molar, o veículo escolhido, a percentagem de AA viável na derme, entre outros fatores, o que dificulta o desenvolvimento de um produto para aplicação tópica contendo AA (PINNELL et al., 2001). Os derivados do AA não mostram a mesma atividade do que o próprio, e os ésteres possuem atividade de vitamina C tanto menor quanto maior for o número de radicais substituídos (TAKASHIMA et al., 1971). O ascorbil 6-palmitato, por exemplo, embora penetre na pele, não é eficiente em sua conversão para o ácido L-ascórbico, a forma ativa da vitamina C, já o ascorbil fosfato de magnésio (VC-PMg) não é capaz de atravessar o estrato córneo. Mesmo sendo derivados efetivos da vitamina C para uso oral, os mesmos não substituem o ácido L-ascórbico em produtos cosméticos para aplicação tópica (AZULAY et al., 2003).

2.4 SISTEMAS PARA VEICULAÇÃO DE ATIVOS

Dentre as estratégias que visam proteger os danos provocados pelos radicais livres, a utilização de substâncias antioxidantes tem recebido merecido destaque. No entanto, essas substâncias devem ser capazes de permear as barreiras naturais da pele para que os ativos tenham efeito. Uma maneira eficaz de melhorar a biodisponibilidade cutânea dos ativos é escolher um sistema de liberação adequado (BRANKA et al., 2007).

Holegaard and Mollgaard, 1985, testaram sistemas binários contendo propilenoglicol (PG) e água em diferentes concentrações. O efeito de sistemas de solventes tais como água e PG e a suas combinações binárias foram estudadas em pele de rato e verificou-se que houve incremento do fluxo, aumentando a permeação de alguns ativos, sendo o máximo obtido com a mistura de 80% de PG. No entanto o fluxo depende do ativo e da concentração de PG no sistema binário (Panchagnula et al., 2001).

Em altas concentrações pode ter efeito contrário e inibir o fluxo. O PG também aumenta os coeficientes de permeação e de partição. O PG pode solubilizar a queratina do estrato córneo, ocupando os locais de ligação de hidrogênio (Yamane et al., 1995).

Diversos outros sistemas contendo tensoativos, água e diferentes fases oleosas também tem sido estudados para a veiculação de ativos, tais sistemas envolvem as chamadas emulsões e/ou os possíveis agregados supramoleculares (microemulsão e cristais líquidos) (SMITH, et al., 2000).

Os sistemas emulsionados são amplamente utilizados em formulações destinadas à aplicação tópica, pois são muitas as vantagens que oferecem sob o ponto de vista farmacêutico e cosmético de tal forma que, colher informações sobre o comportamento do AA presente nestes sistemas e possivelmente predizer o comportamento que tal inclusão proporciona no produto final é mais do que uma necessidade, é uma exigência. Preparações emulsionadas sejam elas viscosas ou não, tendem a ser mais aceitáveis pelos usuários, pois são de fácil aplicação e espalhamento na pele (SMITH et al., 2000; FONSECA, 2007; GENARO, 2000; ANVISA, 2001).

No entanto, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, resultado da mistura de duas fases imiscíveis entre si, estabilizadas por um agente

tensoativo emulsificante (BREUER, 1985). Tais sistemas, porém, podem ser alterados pela temperatura e pelo tempo de armazenamento, além do transporte e manipulação durante o processo de produção (KALLIOINEN et al., 1994; ANVISA, 2004). Podem ser classificadas em O/A (óleo em água) e A/O (água em óleo), dependendo da fase externa, contínua ou também denominada dispersante (SHARMA & SHAH, 1985). No desenvolvimento de uma emulsão cosmética, além do aspecto estético da formulação, o delineamento das propriedades físicas e da estabilidade é fundamental (MOSTEFA et al., 2006). São frequentemente usadas como sistemas de liberação de fármacos ou de ativos cosméticos para uso tópico e consistem, normalmente em misturas complexas de uma grande variedade de excipientes (LASHMAR e BEESLEY, 1992).

Outro aspecto a ser abordado é a possível formação de agregados supra moleculares das moléculas de tensoativos que comumente se auto-agregam na presença de água formando uma rica variedade de estruturas. Sistemas com características isotrópicas de agregados micelares podem ser formadas, enquanto nos sistemas tensoativo-solvente em concentrações mais elevadas, fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir. Esses agregados tornam-se mais estruturados quando um material graxo ou mesmo outros componentes, como outro tenso ativo ou um álcool de cadeia média, é adicionado ao sistema tensoativo-água. Dessa forma, emulsões, microemulsões e sistemas líquido cristalinos liotrópicos de diferentes geometrias podem ser formadas (EZRAHI et al., 1999).

A interação de substâncias ativas com interfaces de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos representa um aspecto importante em tecnologia cosmético/farmacêutica, uma vez que estas estruturas anfifílicas podem ser transportadoras de ativos cosméticos e fármacos (OLIVEIRA et al., 2004).

Danielsson e Lindman, em 1981, definiram microemulsões como sistemas formados por água, óleo e uma substância anfifílica sendo opticamente isotrópicas e termodinamicamente estáveis.

As microemulsões parecem ser ideais quando se deseja obter sistemas de liberação devido às suas vantagens de estabilidade termodinâmica e gotículas muito pequenas (5-100nm), fácil preparo (baixa tensão interfacial e quase sempre formação espontânea), baixa viscosidade (com comportamento newtoniano) e alta capacidade de solubilização, tanto para ativos hidrofílicos quanto para ativos lipofílicos, podendo ser incorporados em conjunto e, em alguns casos, podem

aumentar a absorção cutânea de substâncias ativas (KAUR et al., 2007; BRANKA et al., 2009).

Os cristais líquidos liotrópicos, são misturas de moléculas anfifílicas e solventes que, em determinadas condições de temperatura, pressão e concentrações relativas dos diferentes componentes, apresentam a formação de super estruturas – agregados moleculares – que se organizam no espaço e são representados por mesofases lamelares, hexagonais e cúbicas (NETO e SALINAS, 2005; ZHENG, et al., 2011). Usualmente, um desses solventes é a água. Numa molécula anfifílica coexiste uma região altamente polar do ponto de vista elétrico, e outra apolar. Nas condições de formação do cristal líquido liotrópico as moléculas anfifílicas se auto-organizam formando superestruturas para minimizar o contacto entre a região apolar da molécula e o solvente polar (no caso a água). A parte polar da molécula anfifílica fica em contacto com a água e a região apolar da molécula fica protegida do contacto com a água. Quando esses agregados moleculares são de dimensões da ordem de nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9}$), são denominados micelas. As transições entre as diferentes fases líquido cristalinas se dão por variações na temperatura e/ou concentrações relativas dos componentes da mistura (NETO e SALINAS, 2005).

O estado líquido cristalino combina as propriedades de um líquido e de um sólido, por isso, são também chamados de mesofases que indica um estado intermediário da matéria (MULLER-GOYAMANN, 2004).

A fase lamelar consiste em camadas duplas de tensoativos com grupos polares introduzindo-se nas camadas aquosas (Figura 2). Água e ativos hidrossolúveis podem ser incluídos nas camadas polares o que resulta em um espessamento dessa camada. Analogamente moléculas com a afinidade apolar podem ser aderidas às camadas apolares. Além do aumento da espessura da camada da fase lamelar, também é possível que o aumento da concentração do tenso ativo permita a ocorrência de uma inclusão lateral entre as moléculas, o que transforma a haste das moléculas em cones. Isto leva a uma mudança de fase dependendo do solvente e da molécula que pode ser hexagonal, como mostrado na figura 3 (MULLER-GOYAMANN, 2004).

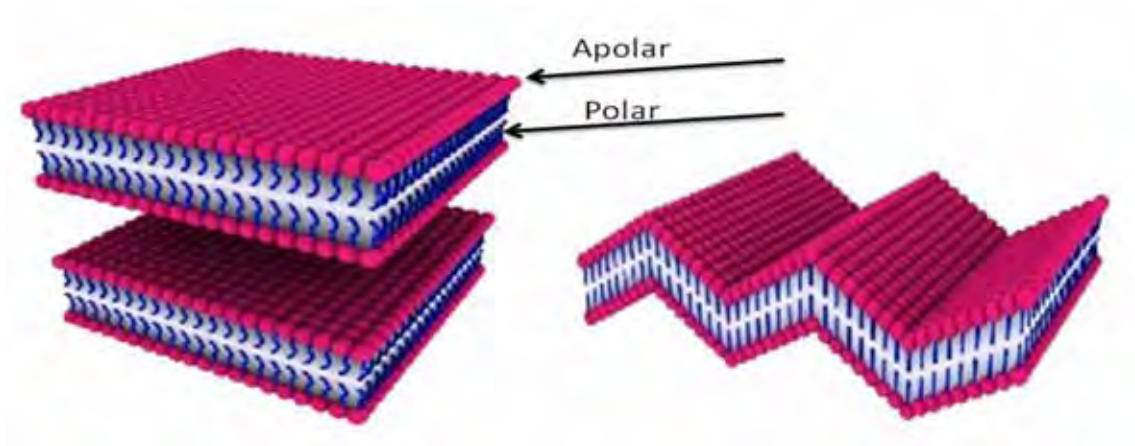


Figura 2. Estrutura de mesofase lamelar (adaptado de NETO e SALINAS, 2005)

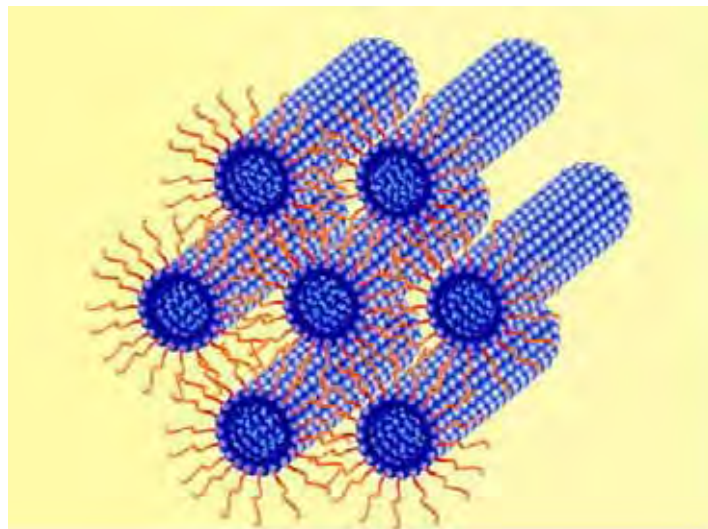


Figura 3. Estrutura de mesofase Hexagonal (LIBSTER et al., 2011)

As estruturas cúbicas foram identificadas em sistemas líquidos cristalinos liotrópicos, onde micelas esféricas apresentam ordem posicional de curto alcance em três dimensões. É uma estrutura opticamente isotrópica (SHAH et al., 2001). A Figura 4, traz um exemplo de mesofase liotrópica na fase cúbica.

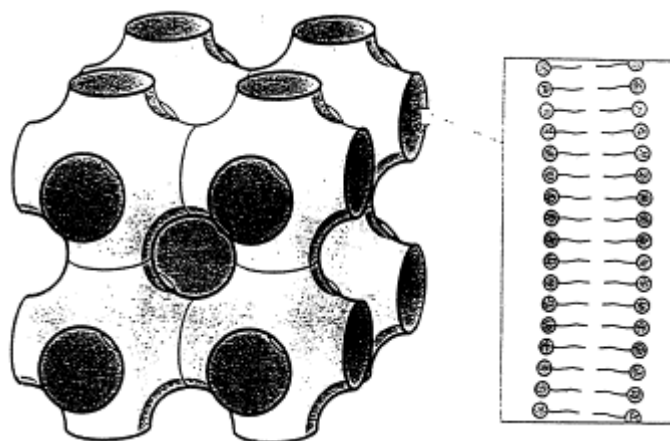


Figura 4. Mesofase liotrópica cúbica. (SHAH et al., 2001)

No desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos, é extremamente importante a escolha dos componentes, de maneira a atingir os critérios desejados, como eficácia, segurança, estabilidade e aceitação pelo consumidor. Logo, a tendência é terem-se cada vez mais disponíveis matérias-primas que permitam bom sensorial e boa estabilidade da formulação, propiciando um prazo de validade viável para comercialização do produto (AYANNIDES et al., 2002; FOX, 1986; LEONARDI, 2004).

Considerando-se a classificação química dos tensoativos em iônicos e não iônicos, os não iônicos, geralmente, são menos afetados pela presença de aditivos (sistemas tamponantes, eletrólitos e conservantes) e mudanças no pH, quando comparados aos tensoativos iônicos, além de serem mais seguros e menos susceptíveis em causar irritação. Dentre os tensoativos, os derivados da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos, têm sido muito utilizados na estabilização de emulsões e construção de sistemas mais complexos (KOGAN e GARTI, 2006; GARTI et al., 2004; KREILGAARD, 2000).

Tanto as microemulsões quanto os sistemas líquidos cristalinos podem ser representados por diagramas de fases. Tais diagramas podem ser ternários (constituído de tensoativo, fases oleosa e aquosa), quaternários (constituído de tenso ativo, co-tensoativo, fase oleosa e aquosa) e diagramas pseudo ternários que apesar de serem formados por quatro constituintes, assumem a forma de diagramas ternários (PAUL e MOULIK, 2001; KREUTER, 1994; KAHLWEIT e STREY, 1987).

2.5 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Para analisar os sistemas obtidos através do diagrama de fases, tem-se utilizado a microscopia de luz polarizada como uma ferramenta útil, para determinar seu comportamento óptico e classificar as fases líquido-cristalinas. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz.

O microscópio de luz polarizada é um microscópio comum, no qual a luz atravessa um sistema polarizado, que polariza as ondas luminosas num só plano. O emprego de um feixe de luz polarizada permite estudar estruturas designadas por anisotrópicas birrefringentes, quando apresenta dois índices de refração diferentes, conforme incidência da luz, e isotrópicas, quando as estruturas não modificam o plano de polarização (ARAÚJO, 2004).

Microemulsões apresentam-se como sistemas líquidos e transparentes com estrutura micelar apresentando isotropia, que sob a luz polarizada apresenta-se como um campo escuro. Já os cristais líquidos podem ser identificados como sistemas viscosos, transparentes ou semi-transparentes, que apresentam estruturas organizadas e anisotrópicas, podendo ser lamelar ou hexagonal, representadas por cruces de malta e estrias respectivamente e, sistemas isotrópicos, como a mesofase cúbica, que apresentam alta viscosidade e quando analisadas por microscopia de luz polarizada, apresentam campo escuro (NORLING et al., 1992; BRINON et al., 1999; HYDE, 2001).

2.6 LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

Quando uma preparação cosmética contendo uma substância ativa é aplicada na pele duas consequências físicas podem ocorrer limitando a permeação cutânea, a liberação do ativo ou composto ativo do veículo usado e/ou a permeação do ativo através da barreira cutânea. Esses dois processos estão intimamente ligados e são dependentes das características físico-químicas do ativo, do veículo e da barreira (pele). O estrato córneo consiste na principal barreira para a permeação cutânea e permite apenas uma limitada permeação da maioria dos ativos cosméticos/farmacêuticos (LAUGEL, et al., 1997).

Os testes *in vitro* tornaram-se importantes ferramentas para que a segurança e eficácia de produtos cosméticos sejam asseguradas o que também é uma tendência visto que a comunidade Européia já não aceita a realização de testes toxicológicos em animais (CHIARI, 2011).

2.7 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA VITAMINA C

A vitamina C pode ser largamente utilizada pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica e também pelo setor magistral. Em razão dessa grande possibilidade de uso existem inúmeros métodos para a sua quantificação (YEBRA-BIURRUN, 2000).

Métodos titulométricos por oxirredução utilizando o N-bromossuccinamida (NBS) como agente titulante, que oxida o AA na presença de iodeto de potássio e amido encontra-se referenciado pela literatura pertinente (BARAKAT et al, 1955, 1973). Já a iodimetria baseia-se na conversão de iodo molecular em íon iodeto. O iodo molecular é um agente oxidante de poder moderado, de tal modo que oxida o AA somente até ácido dehidroascórbico (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Uma proposta alternativa para a quantificação do AA, baseia-se na avaliação de sua capacidade antioxidante, empregando-se o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) que é um radical livre. O DPPH, é solubilizado em solução metanólica e, é capturado por substâncias que tem capacidade antioxidantes, como AA, o que produz um decréscimo da absorvância da solução metanólica de DPPH. Através do decréscimo da absorvância da solução, é possível com o auxílio de um espectrofotômetro a quantificação indireta do AA.

Como o método utiliza para o doseamento, a atividade antioxidante, também é possível que se confirme se a substância que se deseja avaliar tem atividade antioxidante, o que é importante em produto para a pele onde se deseja benefícios contra os radicais livres (MOLYNEUX, 2004).

Outros métodos possíveis, empregam sistemas de análise em fluxo que são baseados na detecção do AA pelo uso de espectrofotômetros e detectores eletroanalíticos. A determinação ocorre pela oxidação de seu grupo 1,2-enediol (YEBRA-BIURRUN, 2000).

Também é possível a quantificação por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) utilizando coluna de troca iônica, onde o mecanismo de separação nesta coluna consiste basicamente de exclusão iônica e partição por fase reversa. No entanto, este método é de alto custo para as indústrias de cosméticos e o setor magistral (ROSA et al, 2007).

O método de escolha deve ser aquele que mais se adequar as condições de trabalho e realidade de custos e disponibilidade de equipamentos.

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas que garantam estabilidade e, portanto a eficácia do AA aplicado tópicamente e que também permita a avaliação da sua estabilidade química através de métodos de baixo custo e de fácil reprodução. Além disso, propõem-se avaliar a liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do AA presente nestes sistemas.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas que auxiliem na manutenção da estabilidade química do AA.
- Avaliar metodologias para a quantificação e selecionar o método mais adequado aos sistemas propostos e validá-lo.
- Avaliar e caracterizar as formulações propostas através de microscopia de luz polarizada
- Avaliar a estabilidade química do AA nos sistemas propostos ao longo de 28 e 90 dias.
- Avaliar a atividade antioxidante dos sistemas
- Avaliar a liberação, permeação e retenção do AA a partir do sistema que tiver a maior capacidade de manter o AA estável.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATÉRIAS-PRIMAS, REAGENTES E SOLVENTES

Ascorbic Acid - Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich)

Sulfuric Acid - Ácido Sulfúrico (Quimis)

Water - Água purificada

Alcohol - Etanol (Labsynth)

Methyl Alcohol - Metanol PA e grau HPLC (Merck, Chemis)

Sodium Hydroxide - Hidróxido de Sódio (Sigma-Aldrich)

Tampão Fostafo pH 7,4

Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich)

Cetearyl Alcohol - Álcool Cetoestearílico (Volp Química)

Ceteareth-20 - Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Volp Química)

Ethylhexyl Stearate - Estearato de octila (Volp Química)

Propylene glycol - Propilenoglicol (Volp Química)

Disodium EDTA - EDTA dissódico (Volp Química)

Methylparaben - Metilparabeno (Volp Química)

Propylparaben - Propilparabeno (Volp Química)

Polysorbate 80 - Polysorbato 80 (Volp Química)

PPG-5-Ceteth-20 - Alcool Eílico Propoxilado e Etoxilado (Volp Química)

Imidazolidinyl Urea - Imidazolidinil Uréia (solução a 50%) (Volp Química)

5.2 EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos (Phoenix AP56)

Balança analítica (Bel Engineering)

Balança analítica (Gehaka®)

Banho ultra-som (Unique Ultrasonic Clear)

Balões Volumétricos 50 mL, 100 mL e 200 mL

Dermatômetro (Nouvag TCM300).

Freezer (Eletrolux Prosdocimo, double D44)

Estufa de ar circulante (Soc Fabel modelo 170)

Espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi U-2001)

Equipamento de permeação Microette (Hanson Research)

Microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000)

5.3 ACESSÓRIOS E VIDRARIAS

Balão volumétrico

Bastões de vidro

Bico de bunsen

Béquer 10 a 200 mL

Cubeta de quartzo

Espatulas de inox

Lâminas de microscopia

Lâminulas de microscopia

Membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich)

Pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL (Eppendorf)

5.4 MÉTODOS

5.4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Foram preparadas seis soluções contendo AA, a 0,01 g/mL, utilizando como sistema solvente água e propilenoglicol em diferentes proporções, conforme a Tabela 1. Foi necessário o uso de agitador magnético para a completa solubilização do AA quando a concentração de propilenoglicol foi de 100%.

Elas foram armazenadas em frascos de vidro ao abrigo da luz e do calor e foram quantificadas em relação ao teor de AA ao longo de 90 dias.

Tabela 1. Proporções de água e Propileno Glicol nas diferentes soluções de AA

	Água	Propileno Glicol
S1	100%	0
S2	75%	25%
S3	50%	50%
S4	25%	75%
S5	10%	90%
S6	0	100%

5.4.2 PREPARO DA EMULSÃO

Os constituintes da emulsão inicialmente proposta para este estudo, descritos na Tabela 2, foram devidamente pesados em balança semi-analítica, em recipientes apropriados. As emulsões foram preparadas por mistura direta da fase aquosa aquecida a 70-80 °C, vertida sobre a fase oleosa aquecida a 60-70 °C. Tais sistemas foram submetidos à agitação manual, com o auxílio de bastão de vidro, até completa homogeneização (PRISTA, 1996; CORREA, 1997). Para a adição do AA, foram reservados 10% da quantidade de água para a solubilização do mesmo. Após 24 horas o AA foi solubilizado em recipiente adequado e, incorporado ao sistema.

Esta emulsão foi armazenada em frasco opaco de dupla face, hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e do calor e o doseamento do AA foi realizado por um período de 90 dias.

Tabela 2 Composição percentual da emulsão proposta

INCI name	Composição percentual (% p/p)	
	F1	F2
Cetearyl Alcohol	9,00	9,00
Ceteareth – 20	1,00	1,00
Ethylhexyl Stearate	1,50	1,50
Propylene Glycol	3,00	3,00
Dissodium EDTA	0,05	0,05
Methylparaben	0,18	0,18
Propylparaben	0,02	0,02
Imidazolidinyl Urea (solução a 50%)	0,20	0,20
Ascorbic Acid	-	1,00
Water	q.s.p.	q.s.p.
	100,00%	100,00%

5.4.3 PREPARO DAS MICROEMULSÕES E SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS

Foram construídos os diagramas de fases ternários para a representação dos constituintes e suas concentrações. A leitura dos digramas deve ser feita em sentido anti-horário como representado na figura 5.

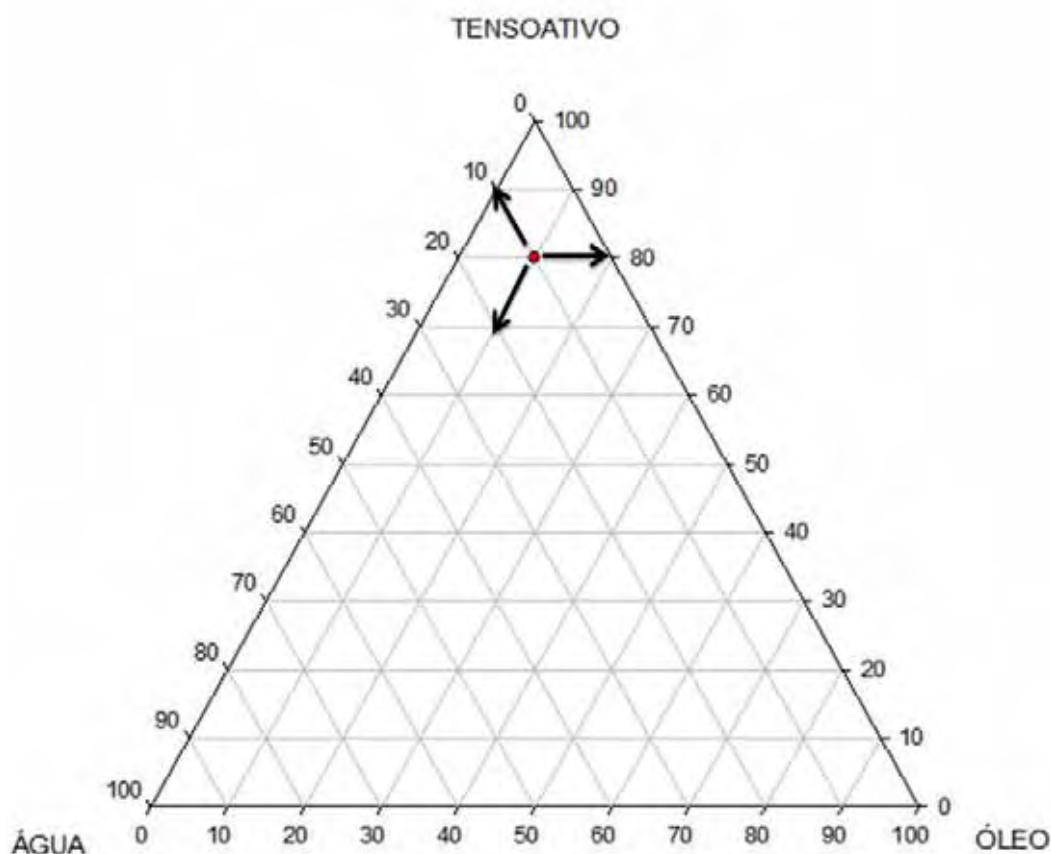


Figura 5. Representação do diagrama ternário de fases.

O ponto em vermelho indica que a concentração usada nesse ponto foi de 80% de óleo, 10% de tensioativo e 10% de água. Foram preparadas 36 formulações constituídas por Polysorbate 80 (Tensioativo), Dicaprilil carbonate (fase oleosa) e Água (fase aquosa). Também foi construído um diagrama com outras 36 formulações alterando-se apenas o tensioativo para o PPG-5-Ceteth-20.

Foram preparadas 5 gramas de cada formulação, respeitando-se os percentuais de cada ponto do diagrama de fases. Adotou-se a seguinte classificação para os sistemas obtidos através do diagrama de fases:

STBV - Sistema Transparente de Baixa Viscosidade

STVI - Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária

STAV - Sistema Transparente de Alta Viscosidade

SSTBV - Sistema Semi-Transparente de Baixa Viscosidade

SSTVI - Sistema Semi-Transparente de Viscosidade Intermediária

SSTAV - Sistema Semi-Transparente de Alta Viscosidade

SF - Separação de Fases

E - Emulsão

SO - Sistema Opaco

Após a manipulação, as formulações que não apresentaram separação de fases, foram armazenadas em recipiente âmbar, bem vedado e protegido da luz.

Os sistemas STBV, STVI, STAV, SSTBV, SSTVI e SSTAV foram avaliados, com auxílio de microscopia de luz polarizada, de modo a caracterizar no diagrama de fases se o sistema obtido apresentava-se como um sistema líquido cristalino ou microemulsão.

5.4.4 DETERMINAÇÃO DO pH DAS FORMULAÇÕES

Foi determinado o valor de pH das formulações F1 (emulsão sem AA) e F2 (emulsão com AA) em peagômetro digital (Gehaka PG-1800). Para isto, foram preparadas amostras diluídas a 10% (DAVIS, 1977). Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4.5 QUANTIFICAÇÃO DO AA

Foram utilizados três métodos para a quantificação do AA, dois métodos titulométricos, que utilizam o NBS e o IODO como agentes titulantes e o método de inibição do radical DPPH (MIR), todos de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Os métodos titulométricos são métodos validados, por isso, não necessitaram ser validados, já, porém, o MIR, necessitou ser validado. Para a realização das três metodologias de quantificação, foram usadas vidrarias calibradas, identificadas e o mesmo operador executou as operações para que não houvesse interferência dos equipamentos e erro operacional durante a quantificação. Para a quantificação das soluções binárias contendo AA foi utilizado 2 mL das mesmas dissolvidos em 100 mL de água isenta de dióxido de carbono. Para a emulsão, micro emulsão e

sistemas líquidos cristalinos foram utilizados 1g do referido sistema solubilizado em 100 mL de água deionizada.

As determinações do teor de AA foram realizadas a cada sete dias e todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Foi determinada a média e o desvio padrão, além de análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando adequado. A análise estatística e plotagem dos gráficos foi realizada utilizando o software Origin 7.

5.4.5.1 PADRONIZAÇÃO DOS AGENTES TITULANTES, IODO E NBS

Em um erlenmeyer foram adicionados 5 mL de solução de iodo/NBS, 5 mL de solução KI 4%, 1 mL ácido acético glacial e 1 mL de amido. A titulação foi realizada com solução de tiosulfato de sódio (3,11605 g/100 mL de água) (Figura 6).

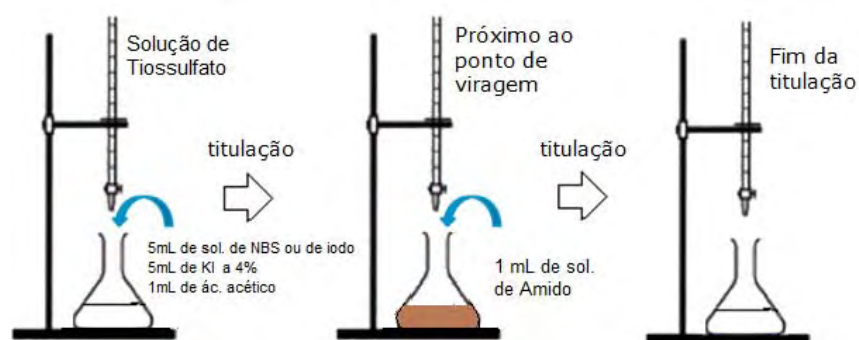


Figura 6 Esquema da padronização da solução de iodo e NBS

5.4.5.2 PADRONIZAÇÃO DO TIOSSULFATO DE SÓDIO

Em outro erlenmeyer foram adicionados 5 mL de KI 20%, 5 mL de HCl 6N, 5 mL de solução de KBrO_3 ($2,79 \cdot 10^{-3} \text{g/mL}$), utilizado como padrão primário, e 1 mL de amido, quando a titulação estava próximo ao ponto de viragem, utilizando o tiosulfato de sódio como agente titulante (Figura 7).

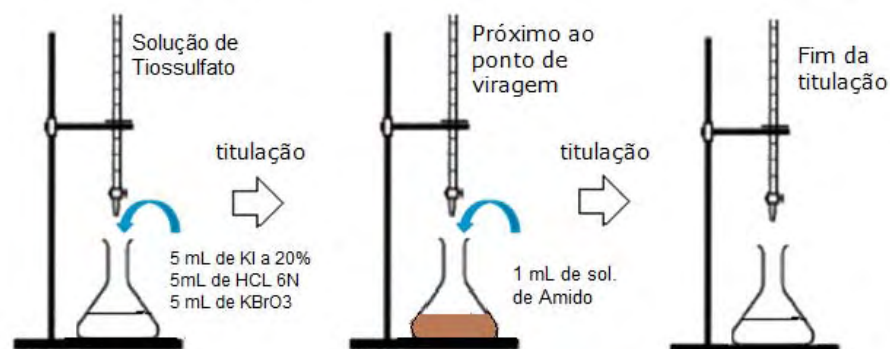


Figura 7. Esquema da padronização da solução de tiosulfato de sódio

5.4.5.3 QUANTIFICAÇÃO DE AA POR IODIMETRIA

Este método de quantificação do AA, estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010), preconiza a adição de 2 mL da solução de AA em 100 mL de água isenta de dióxido de carbono acrescida de 25 mL de ácido sulfúrico 10% (p/v) (Figura 8). Após a realização deste procedimento, a solução foi imediatamente titulada com iodo 0,05 M e próximo ao ponto de viragem, 1 mL de amido foi acrescentado. Cada mL de iodo 0,05 M equivale a 8,806 mg de $C_6H_8O_6$.



Figura 8. Esquema da iodimetria

Para preparar a solução de iodo, 13 g de iodo foram solubilizados em 100 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 20% e o volume completado para 1 litro com água.

5.4.5.4 QUANTIFICAÇÃO DE AA UTILIZANDO NBS COMO AGENTE TITULANTE

Em um erlenmeyer foi adicionado 5 mL de solução de KI a 4%, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL da solução de AA, 1 mL de amido (usado para facilitar a visualização do ponto de viragem). A titulação foi realizada com NBS (0,7117 g/100 mL) de água (Figura 9) (BARAKAT et al, 1955, 1973).



Figura 9. Esquema da titulação com NBS

5.4.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DO AA ATRAVÉS DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR)

Para validar a metodologia foram analisados: a especificidade, a linearidade, a precisão, a sensibilidade, o limite de quantificação, o limite de detecção e a exatidão e robustez deste método, segundo a Resolução-RE N°899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

5.4.6.1 LINEARIDADE

Foram obtidas três curvas experimentais, a partir de, pelo menos, dez concentrações diferentes do AA, sendo que cada uma das concentrações em cada uma das curvas foram preparadas em triplicata.

5.4.6.2 EXATIDÃO

A exatidão foi determinada pela avaliação da recuperação, ou seja, quantidades conhecidas de AA foram utilizadas e a relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica foi avaliada.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

5.4.6.3 LIMITE DE DETECÇÃO

A estimativa do limite de detecção foi feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, através da equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações da substância ativa próximas ao suposto limite de quantificação. *IC* é a inclinação da curva analítica.

5.4.6.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação do método pode ser calculado através da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. *IC* é a inclinação da curva analítica.

5.4.6.5 PRECISÃO

Pode ser considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrída), Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e Reprodutibilidade (precisão inter-manipulador).

A precisão do método analítico foi calculado como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100, \text{ onde:}$$

DPR é o desvio padrão relativo,

DP é o desvio padrão, e,

CMD é a concentração média determinada.

5.4.6.6 REPETITIVIDADE OU PRECISÃO INTRA-CORRIDA

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste. Este procedimento foi repetido em um curto intervalo de tempo, ou seja, foi realizado durante a manhã e durante a tarde de um mesmo dia, com o mesmo equipamento e operador.

5.4.6.7 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA OU PRECISÃO INTER-CORRIDAS

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes. Portanto, este parâmetro foi verificado em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, em dias diferentes.

5.4.6.8 REPRODUTIBILIDADE

É a concordância entre os resultados obtidos com manipuladores diferentes. Também foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada.

5.4.6.9 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Soluções de concentrações conhecidas de AA foram contaminadas com quantidades adequadas do creme base. Em seguida, os resultados obtidos foram comparados com o da curva analítica construída. Também foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. E a especificidade e seletividade foram expressas como desvio padrão relativo (DPR).

5.4.6.10 ROBUSTEZ

A robustez foi determinada através da variação do fabricante de um dos solventes utilizados no método, o metanol. A robustez do método foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos valores obtidos, com os descritos na curva analítica.

5.4.6.11 CURVAS ANALÍTICAS COM SOLVENTES DIFERENTES

Após o método ter sido validado, duas novas curvas analíticas foram construídas com outros solventes utilizados neste estudo. A validação foi efetuada utilizando a água como solvente para o AA, entretanto, na avaliação da liberação do AA da formulação, durante o ensaio de permeação e retenção cutâneas e, mesmo durante os estudos da estabilidade do AA no cosmético, foram utilizados como solventes tampão fosfato (pH=7,4) e metanol.

5.4.6.12 QUANTIFICAÇÃO DO AA ATRAVÉS DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR)

Devido à elevada atividade antioxidante apresentada pelo AA e pela relação linear verificada entre a concentração de AA e a atividade antioxidante apresentada por esta substância, um método de quantificação indireto do AA foi utilizado. Para sua aplicação, preparou-se uma curva analítica da concentração de AA *versus* a porcentagem de inibição do radical livre DPPH.

A avaliação da atividade antioxidante das formulações foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo metodologia descrita por Mensor et al. (2001) e Falcão et al. (2006), com modificações.

Para a construção da curva analítica, 1 mL da solução aquosa de AA, em diferentes concentrações (de 0,5 a 5 µg/mL), foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,004%). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz e, após 30 minutos, foi determinada a absorbância a 515 nm.

Foram utilizadas soluções controle contendo apenas 1 mL de água e 2,5 mL da solução metanólica de DPPH a 0,004%. A média das absorbâncias destas amostras foi usada como a absorbância máxima, servindo para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (% de inibição) (MOLYNEUX, 2004).

% de inibição do radical DPPH = $[(A_{m\acute{a}x} - A_{teste}) / A_{m\acute{a}x}] \times 100$, onde:

$A_{m\acute{a}x}$ é a absorbância do DPPH em 515 nm na ausência de amostra (controle).

A_{teste} é a absorbância do DPPH em 515 nm na presença de amostra.

O ensaio do DPPH para cada concentração foi realizado em triplicata.

Para a quantificação do AA nas soluções ao longo do tempo, o mesmo procedimento descrito acima para a verificação da atividade antioxidante foi realizado. Em seguida, a porcentagem de inibição do radical DPPH obtida com cada solução foi substituída na equação obtida com a regressão linear da curva analítica e a concentração de AA na solução foi determinada.

5.4.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO

Os testes de liberação, permeação e retenção cutânea foram realizados, sob “sink conditions”, na concentração de 1% de AA presente no sistema que apresentou maior estabilidade. Os experimentos foram realizados com as células de Franz cobertas para que não houvesse incidência de luz, e assim minimizasse a degradação do AA liberado ou permeado.

5.4.7.1 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO AA CONTIDO NO SISTEMA

A avaliação da liberação do AA, foi realizada de acordo com metodologia descrita por Marquele et al. (2006) e OECD (2004).

Os ensaios de liberação foram desenvolvidos utilizando células de Franz modificadas (Figura 10) com área de difusão de 1,77 cm², no equipamento Microette (Hanson Research) e membrana de celulose (Sigma-Aldrich).

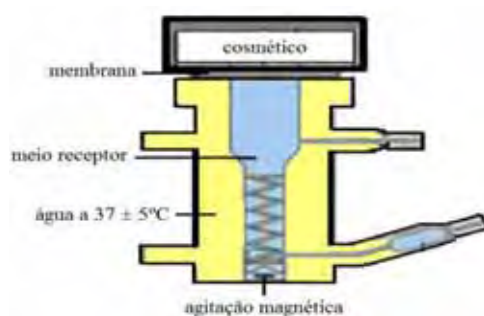


Figura 10. Célula de Franz (modificado de www.hansonresearch.com)

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 7,0 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Amostras de 250 mg da preparação foram acondicionadas sobre a membrana. Em uma das células foi colocada 250mg de preparação isenta de AA e, tal preparação foi considerada o branco para as leituras em espectro.

A solução tampão fosfato foi preparada segundo a Farmacopéia Americana, (USP 30, 2007), adicionando-se 50 ml de solução de fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 0,2M a 39,1ml de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M. O pH foi

verificado em peagômetro e procedidos os ajustes para pH 7,4, com HCl puro ou solução de NaOH 10%.

A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a $37 \pm 5^\circ \text{C}$ por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas.

A quantidade de AA liberado da formulação foi avaliada após $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 e 8 horas de ensaio.

Os experimentos foram repetidos cinco vezes para cada tempo. Como a quantidade de amostra utilizada para a quantificação pelo MIR, era de 1 mL por amostra e as quantificações foram realizadas em triplicata, não foi possível utilizar a reposição do meio receptor. Sendo assim, para cada tempo de coleta foram realizados experimentos independentes.

A quantidade de AA liberado foi avaliada através da % de inibição do radical DPPH causada pela solução receptora. Como branco da reação, foi utilizada a reação entre o DPPH e a solução receptora de uma célula de Franz modificada, que tinha como amostra a emulsão F1.

5.4.7.2 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA AA CONTIDO NO SISTEMA

Este ensaio foi desenvolvido da mesma maneira como descrito no item 5.4.7.1, para avaliação da liberação do AA na preparação cosmética, entretanto, foi utilizada membrana biológica. A membrana biológica escolhida foi pele dissecada da orelha de porco, sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme. As orelhas de porco não escaldadas foram adquiridas do Abatedouro Olhos d'Água (Ipuã - SP). Antes de iniciar o experimento as peles foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele que equivale a epiderme e derme (500 μm) utilizando um dermatômetro (Nouvag TCM300).

5.4.7.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO NO ESTRATO CÓRNEO, EPIDERME E DERME CONTIDO NO SISTEMA

Para a avaliação da retenção do ativo no estrato córneo, epiderme e derme, empregou-se a mesma pele utilizada no estudo da permeação cutânea.

Decorridas 2, 4 e 8 horas de permeação *in vitro*, a pele da orelha de porco foi retirada do aparelho de difusão. Para a avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme, a técnica utilizada foi a de *tape stripping*, na qual o estrato córneo é removido sequencialmente após aplicações repetidas de fitas adesivas, possibilitando determinar a quantidade de substância ativa presente na primeira camada da pele. Foram então aplicados 10 pedaços de fitas (3M) e retiradas na área da membrana biológica exposta à amostra. As fitas adesivas foram então mergulhadas em 4 mL de metanol. A suspensão resultante foi submetida à sonicação em ultra-som para o rompimento das células por 30 minutos e agitação em vórtex por 5 minutos. A suspensão resultante foi analisada pelo MIR (BETTONE, 2009)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PREPARO DOS SISTEMAS

6.1.1 SOLUÇÕES

As seis soluções foram preparadas com propilenoglicol (PG) e água, um sistema binário com diferentes proporções dos solventes conforme descrito anteriormente na tabela 1. Willmot e colaboradores em 1991 utilizaram o propilenoglicol em um sistema binário, constituído por uma mistura de dois solventes orgânicos (propilenoglicol e álcool) e água. Essa mistura de solventes foi utilizada por diminuir os níveis de solubilidade do AA no sistema, onde a concentração de água não poderia ultrapassar a 12%, para não afetar a estabilidade do sistema. A estabilidade foi alcançada com a mistura dos solventes orgânicos, o que torna o propilenoglicol, um solvente interessante tanto pelos resultados alcançados por este estudo, quanto por ser também um facilitador no aumento do fluxo de alguns ativos cosméticos/farmacêuticos, o que pode facilitar a permeação de ativos na pele. (PANCHAGNULA et al., 2001).

A água foi adicionada primeiramente, logo em seguida adicionou-se o AA para que ocorresse a solubilização do mesmo. Após o AA ser solubilizado foi adicionado o PG. No entanto na formulação S6 houve dificuldade de solubilização do AA, já que nessa solução a concentração era de 100% de PG. Tal situação exigiu o auxílio de um agitador magnético por um período aproximado de 2 horas para sua completa solubilização.

Após a solubilização do AA prosseguiu-se com a quantificação através dos métodos de titulométricos que utilizam o Iodo e NBS como agentes titulantes e o MIR. Esses métodos foram selecionados por serem de baixo custo e de fácil realização.

6.1.2 EMULSÕES

A fase hidrofóbica da emulsão foi preparada com álcool cetosteárilico, um álcool graxo usado em cosméticos como agente sobreengordurante e espessante, principalmente em sistemas do tipo O/A e, também, pelo estearato de octila, um emoliente não-comedogênico de alta compatibilidade dérmica e médio coeficiente de espalhabilidade, possuindo amplo espectro de aplicação (HANDBOOK, 2003).

Na fase hidrofílica foram incluídos os conservantes antimicrobianos, metilparabeno e propilparabeno, o Propileno Glicol como umectante e solvente para os parabenos, o EDTA Na₂ (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico), um agente sequestrante capaz de formar complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, além da imidazolidinil uréia que é um conservante muito eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. A imidazolidinil uréia apresenta ampla faixa de compatibilidade com ingredientes cosméticos, incluindo tensoativos não iônicos, catiônicos, aniônicos e proteínas. Quando combinada com os parabenos oferece um sistema conservante de amplo espectro contra bactérias, fungos e leveduras (HANDBOOK, 2003).

O AA foi incorporado na emulsão 24 horas após o preparo da mesma, pois as quantificações foram realizadas sempre no dia seguinte, independente do método utilizado. Para incorporar o AA reservou-se 5% da quantidade total de água da formulação com o objetivo de solubilizá-lo e após, promoveu-se a transferência do AA solubilizado para a emulsão sob adequada agitação.

A adição de AA na (F2) causou variação do pH quando comparada com a formulação F1 isenta de AA. A tabela 3 mostra os valores encontrados após as medições de pH.

Tabela 3. Valores de pH das formulações estudadas

Formulação	Valores de pH
F1	5,45
F2	3,03

Os resultados comparativo entre o pH das formulação F1, isenta de AA, com a fórmula F2, contendo o AA, reflete o esperado. Devido ao caráter ácido do AA, sua presença no meio reduziu significativamente o pH da preparação.

6.1.3 SISTEMAS CONTENDO AGREGADOS SUPRA MOLECULARES

Foram construídos 2 diagramas de fases, e foram diferenciados pelo tenso ativo. No entanto, o diagrama constituído pelo PPG-5-Ceteth-20, foi excluído dos ensaios já que um teste prévio mostrou que o sistema obtido e selecionado formava grumos quando era adicionado de água, durante o processo de solubilização necessário para as quantificações aplicáveis em todos os três métodos selecionados para a análise. Deu-se então seguimento nos ensaios apenas com o diagrama contendo Polysorbate 80 como tensoativo. A escolha da fase oleosa composta por Dicaprilil Carbonato se deve ao fato do mesmo ser considerado, um emoliente não-comedogênico de alta compatibilidade dérmica e médio coeficiente de espalhabilidade, com toque seco, possuindo amplo espectro de aplicação (HANDBOOK, 2003).

A microscopia de luz polarizada é uma técnica que permite a classificação quanto à isotropia e anisotropia dos sistemas, permitindo diferenciar microscopicamente os tipos de estruturação. Os sistemas isotrópicos são aqueles que não desviam luz sob o plano de luz polarizada, e os anisotrópicos desviam luz sob o plano de luz polarizada. Os sistemas anisotrópicos podem ser sistemas líquidos cristalinos de fase lamelar ou de fase hexagonal, já os sistemas isotrópicos podem ser os sistemas líquidos cristalinos de fase cúbica ou as micro ou nanoemulsões.

Os sistemas de fase lamelar são formados por bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, normalmente água, organizadas paralelamente e planamente umas com as outras, formando uma rede unidimensional (EZRAHI et al., 1999).

Se os agregados de tensoativos formarem cilindros indefinidamente longos no lugar de bicamadas, dois tipos de estruturas bidimensionais podem ser formadas, fase hexagonal normal ou inversa. Na fase hexagonal normal, as moléculas de

tensoativo agregam-se em micelas cilíndricas circulares que se empacotam, e uma região aquosa contínua preenche os espaços entre os cilindros (EZRAHI et al., 1999).

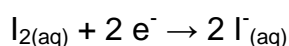
A fase cúbica apresenta estrutura bem diferenciada, mais complicada e visualizada com maior dificuldade que as outras fases. São estruturas tridimensionais que podem ser classificadas em dois tipos: cúbica bi contínua e cúbica micelar (EZRAHI et al., 1999).

As microemulsões, emulsões e cristais líquidos de fase cúbica puderam ser diferenciados visualmente visto que, as microemulsões são sistemas, normalmente líquidos e transparentes, as emulsões apresentam-se opacas, e os sistemas de estrutura cúbica apresentam-se transparentes ou translúcidos e muito viscosos. Os sistemas de estrutura cúbica, as emulsões e as microemulsões, apresentam isotropia e conseqüentemente, diante da luz polarizada, demonstram campo escuro (EZRAHI et al., 1999).

Esses sistemas contendo agregados supra moleculares, não puderam ser determinados pelos métodos de iodimetria e NBS por formarem grumos insolúveis e alterar a cor da solução formada para a titulação. Apenas os sistemas produzidos e representados pelo diagrama constituído por Polysorbate 80 pode ser determinado pelo método que utiliza o radical DPPH.

6.2 QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES PELO MÉTODO DE IODIMETRIA

O método da iodimetria baseia-se na conversão de iodo molecular em íon iodeto, de acordo com a semi-reação:



O iodo molecular é um agente oxidante de poder moderado, de tal modo que oxida o AA somente até ácido dehidroascórbico (Figura 11).

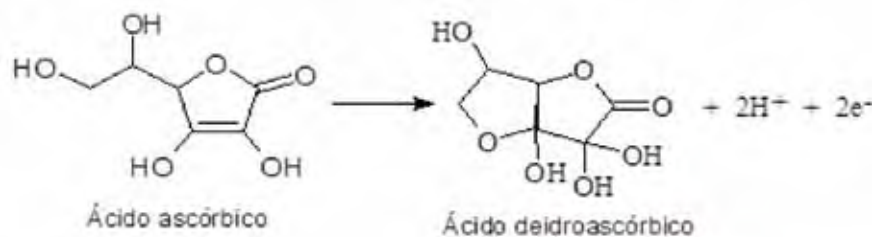


Figura 11. Reação de oxidação do ácido ascórbico à ácido deidroascórbico

Após o sistema binário constituído por propilenoglicol e água, ser dissolvido em água, adicionou-se a solução de amido, que é o indicador, e quantidade de iodo suficiente para reagir completamente com o AA presente na solução.

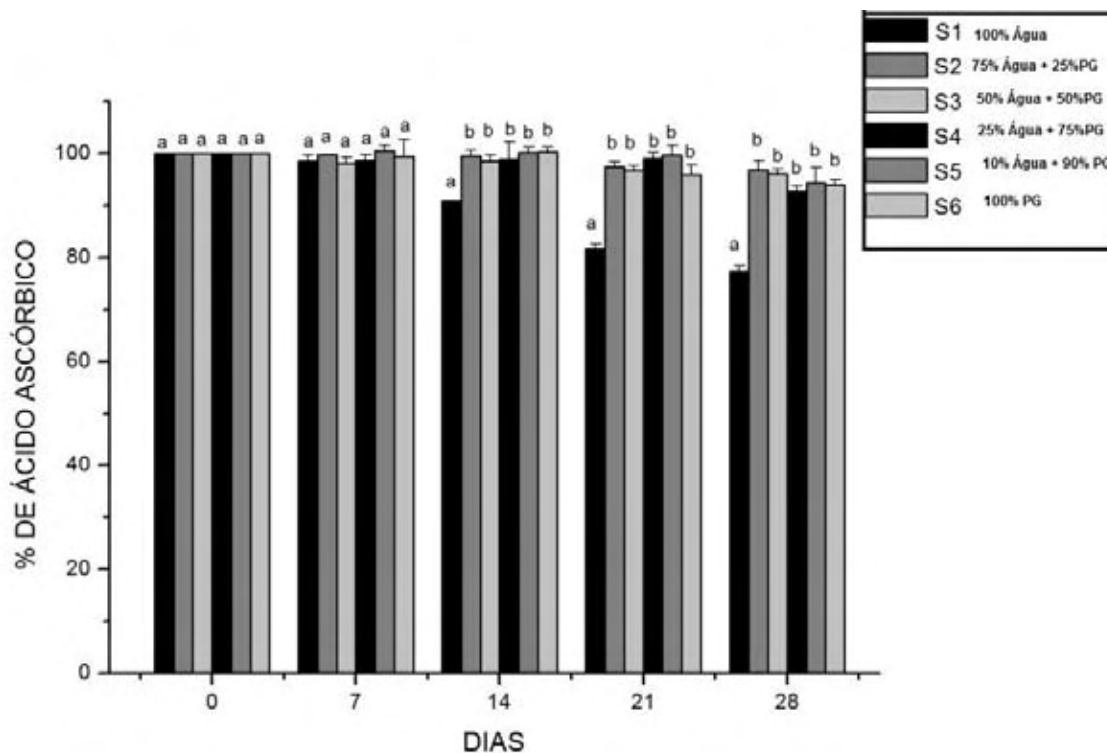
O AA provoca a redução do iodo a iodeto que em solução aquosa é incolor. O iodo reduzido não pode reagir com a molécula de amido, mas quando ocorre o consumo total das moléculas de AA, as moléculas de iodo em presença de iodeto reagem com as macromoléculas de amido formando complexos de adsorção com os íons triiodeto, conferindo coloração azul intensa à mistura de reação. Isto ocorre porque o amido é uma substância formada por dois constituintes chamados de: amilose, solúvel em água, e amilopectina, insolúvel em água. A amilose é uma parte do amido que produz a cor azul intensa quando reage com as moléculas de iodo formando o complexo de amido-iodo.

Para determinação da massa de AA presente nas soluções, foi realizados os seguintes cálculos que são válidos para os dois métodos analíticos utilizados:

Normalidade (N) do $\text{KBrO}_3 = (\text{massa pesada de } \text{KBrO}_3 / \text{PM} / 6) / \text{volume em litros da solução preparada}$.

6.2.1 Comparação entre as soluções no mesmo dia pelo método de iodimetria

No gráfico representado pela Figura 12, pode-se comparar a concentração de AA presente nas soluções em um mesmo dia, tornando desta forma, possível visualizar qual solução apresentou maior quantidade de AA em um determinado dia, utilizando o método da iodimetria preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010).



^{a,b} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

Figura 12. Gráfico representando as concentrações de AA em percentagem, presentes nas diferentes soluções binárias – propilenoglicol/água, comparadas no mesmo dia e durante 28 dias, empregando-se a Iodometria como método analítico.

A quantificação realizada logo após a preparação das soluções (dia 0) foi considerada como a concentração máxima de AA, portanto 100%.

No dia 7, todas as soluções apresentaram concentração estatisticamente semelhante de AA. Após 14 dias de estocagem, houve redução na concentração de AA no sistema S1 (100% água), mantendo apenas 90,93% da concentração inicial. Essa maior tendência à oxidação do sistema S1, somente aquoso, quando comparada às demais soluções, permanece até o dia 28, em que o sistema S1, continua com a menor concentração de ativo, chegando a 77,30% da concentração inicial.

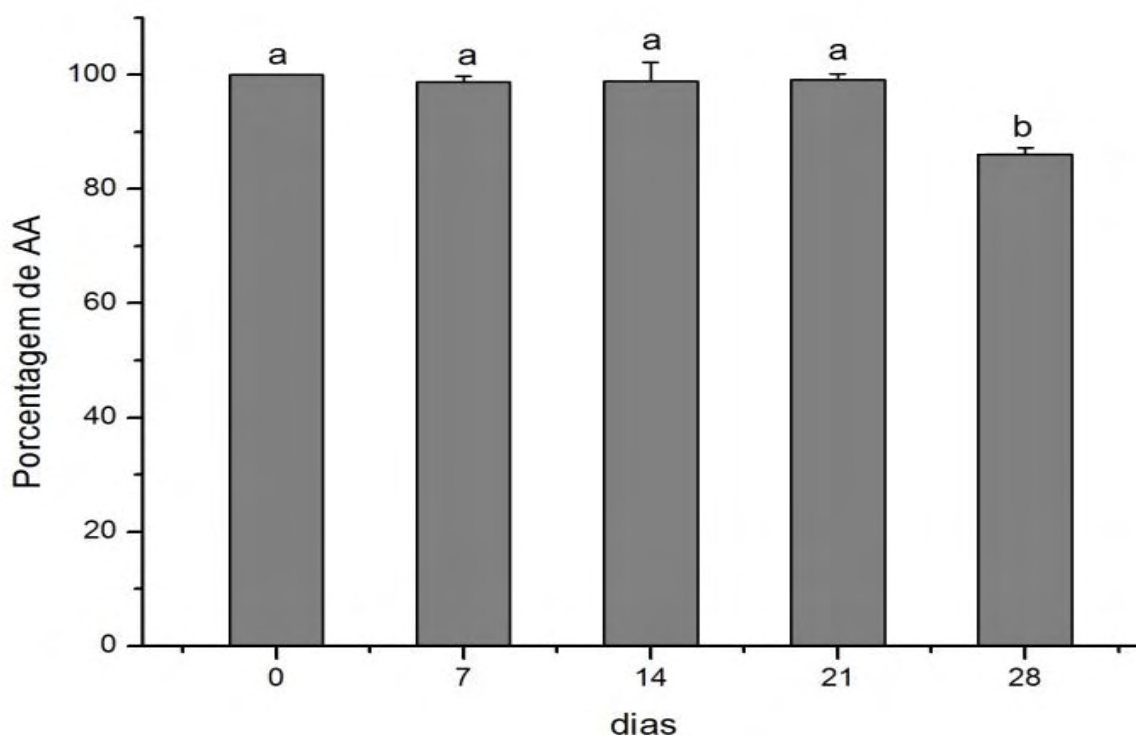
As demais soluções apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si em todos os dias de medida analisados e, o sistema S2, apresentou a maior porcentagem de AA neste período, terminando os 28 dias com 96,77% de AA. As demais soluções apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si em

todos os dias de medida analisados, com média de manutenção de 94,76% da concentração de AA inicial.

Foi verificada redução no teor de ativo ao longo do tempo, sendo que a maior redução foi observada no dia 28, comprovando que quanto maior o tempo de armazenamento, maior a perda de ativo.

6.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO POR IODIMETRIA

A figura 13 representa os valores de concentração de AA presentes na emulsão em relação ao tempo. Através de sua análise pôde-se notar que pelo método da iodimetria, a concentração de AA se manteve inalterada até o dia 21, apresentando oscilações que não foram significativamente relevantes de acordo com o teste estatístico ANOVA. No último dia de quantificação, observou-se que a concentração de AA diminuiu para 81% da quantidade inicial.



^{a,b} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

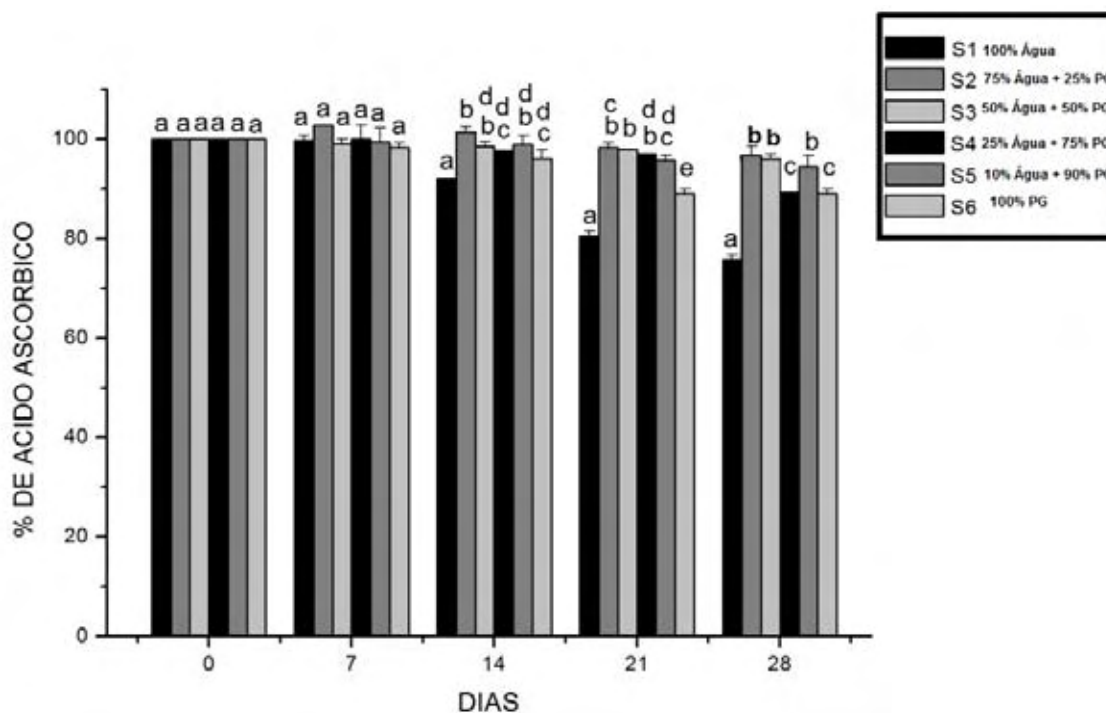
Figura 13. Gráfico representando os resultados quantitativos das concentrações de AA presente na emulsão após 28 dias, aplicando-se a iodimetria como método analítico.

6.3 QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES CONTENDO AA UTILIZANDO NBS COMO AGENTE TITULANTE

Nesta titulação o NBS oxida o AA na presença de iodeto de potássio e amido. Quando a NBS está em excesso (ou seja, a reação é completa), o NBS liberta o iodo do iodeto de potássio e forma complexos com amido, produzindo coloração azul ou preta, o que indica o ponto final da titulação.

6.3.1 COMPARAÇÃO ENTRE AS SOLUÇÕES NO MESMO DIA POR NBS

No gráfico da Figura 14 é possível comparar a concentração de AA presente nas soluções em um mesmo dia, assim é possível visualizar qual solução apresentou maior quantidade do respectivo produto em um determinado dia utilizando o método do NBS.



^{a,b,c,d,e} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 14. Gráfico representando as concentrações de AA em percentagem, presentes nas diferentes soluções binárias – propilenoglicol/água, comparadas no mesmo dia e durante 28 dias, aplicando-se NBS como método analítico.

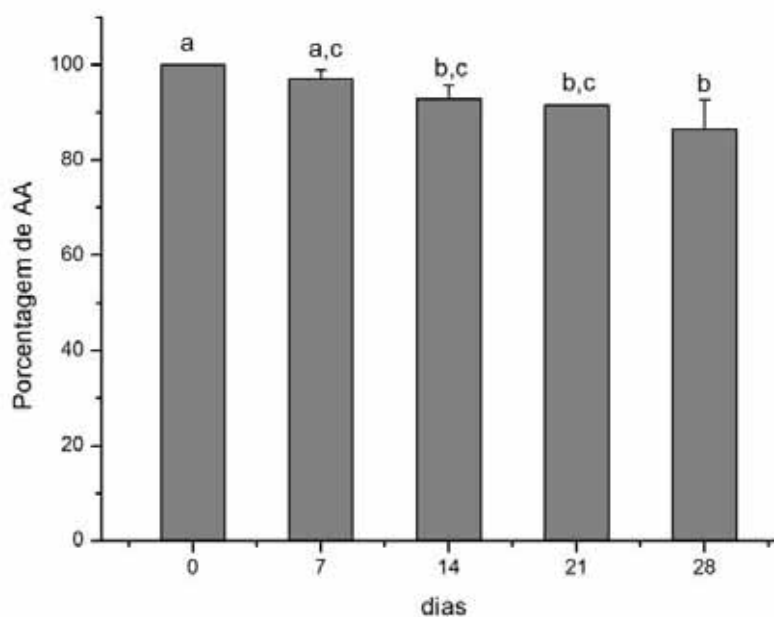
A primeira quantificação (dia 0) foi considerada como sendo 100% da concentração de AA a fim de avaliar a degradação de ativo ao longo do tempo em cada sistema. Após sete dias de estocagem, as soluções foram novamente quantificadas, e observou-se que todas apresentaram valores estatisticamente iguais de AA.

Assim como na iodimetria, através deste método pôde-se observar que, a partir do dia 14, a S1 apresentou maior redução de AA ao longo dos 28 dias quando comparada com as outras soluções.

No dia 28, o último dia de análise, a S1 continuou apresentando a menor concentração de AA com perda de 24,19% de ativo, seguida das S4 e S6. As soluções que mais preservaram o AA foram S2, S3 e S5, destacando-se novamente em valores absolutos, como no método iodimétrico a S2.

6.3.2 QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO POR NBS

Avaliando a degradação de princípio ativo ao longo do tempo na emulsão (Figura 15), pôde-se notar que pelo método do NBS, a concentração de AA foi reduzindo a partir do dia 14, apresentando oscilações significativamente relevantes de acordo com o teste estatístico ANOVA. No último dia de quantificação, observou-se que a concentração de AA decresceu a 86% da quantidade inicial.



a,b,c Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 15. Gráfico representando os resultados quantitativos das concentrações de AA presente na emulsão após 28 dias, aplicando-se NBS como método analítico.

Tanto o método realizado por iodimetria como o método que emprega o NBS como agente titulante tiveram que ser abandonados por não conseguirem quantificar os sistemas contendo agregados supramoleculares, devido à não solubilização do sistema contendo PPG-5 Ceteth-20 em água e pelo fato do sistema contendo Polysorbato 80 produzir coloração indesejável. Apesar, dos dois métodos se mostrarem efetivos para a quantificação dos sistemas binários, os resultados apresentados nas análises do sistema emulsão tiveram valores divergentes estatisticamente ao final dos 28 dias.

6.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE AA ATRAVÉS DO MÉTODO DO DPPH

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou

quantitativa do material analisado seja confiável e reprodutível (RANDAU et al., 2005).

Neste trabalho, um dos métodos analíticos empregado baseou-se na quantificação, realizada de forma indireta, por meio do radical DPPH, ou seja, através da avaliação da atividade antioxidante, uma vez que esta é uma das principais propriedades do AA. Sendo assim, foi possível quantificar o AA presente em meios de análises específicos, através da relação obtida entre a concentração de AA *versus* a atividade antioxidante, em uma curva analítica construída.

Dentre os métodos de escolha o MIR foi validado por ser eficiente na quantificação de todos os sistemas propostos, diferentemente dos métodos por Iodimetria e NBS como agentes titulantes, já que não foram adequados para os sistemas contendo agregados supramoleculares.

Sua validação foi realizada em concordância com a Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Segundo esta resolução, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos cosméticos/farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, a validação foi aplicada com o objetivo de demonstrar que a metodologia de quantificação do AA por meio da atividade antioxidante é adequada, sendo útil durante o desenvolvimento de todo este trabalho.

6.4.1 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Foram construídas três curvas analíticas da porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* a concentração da solução (Figuras 16 a 19).

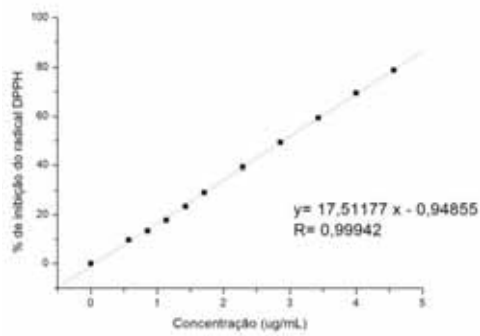


Figura 16. Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método

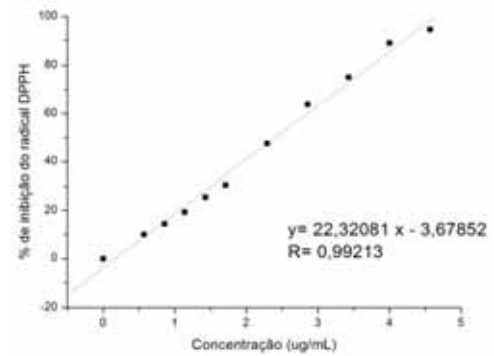


Figura 17. Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método

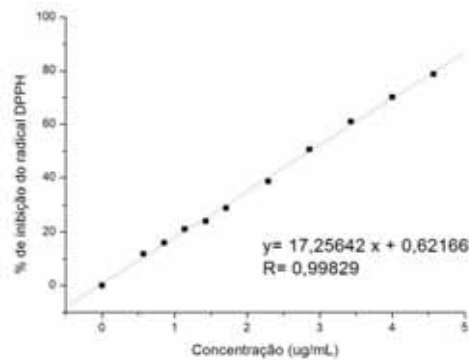


Figura 18. Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método

De acordo com as curvas analíticas obtidas, o método foi considerado linear, pois segundo a ANVISA (2003), para que isto aconteça os valores de R devem ser maiores que 0,99, comportamento este, observado nas curvas construídas. Portanto, uma nova curva foi construída a partir do tratamento estatístico das curvas experimentais 1, 2 e 3, com média e desvio padrão de cada um dos pontos (Figura 19).

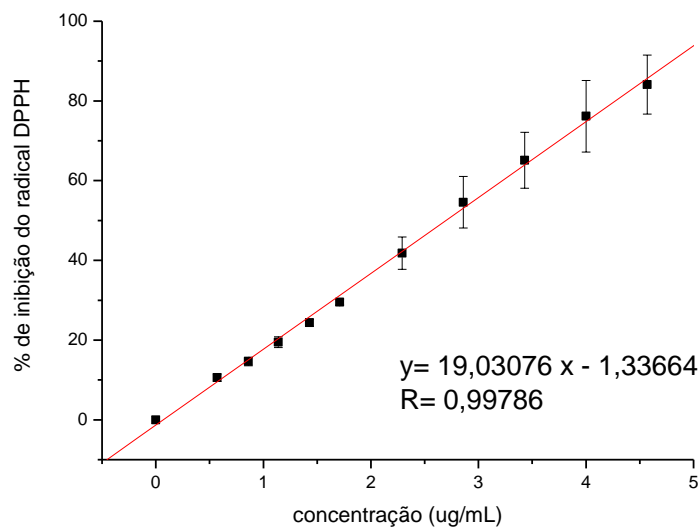


Figura 19. Média das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método

Na curva média obtida, o valor do coeficiente de correlação (R) é de 0,9978; a intersecção com o eixo y é igual a -1,3358 e o coeficiente angular é igual a 19,033. Estes valores são os parâmetros necessários extraídos da curva analítica que foram utilizados posteriormente para a quantificação da solução por meio da atividade antioxidante.

6.4.2 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

Para isto, concentrações conhecidas de soluções, denominadas concentrações teóricas, foram submetidas à análise da atividade antioxidante e, por meio da equação obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do AA

Concentração teórica (ug/mL)	Concentração	Concentração	Concentração	Exatidão (%)
	Experimental 1 (ug/mL)	Experimental 2 (ug/mL)	Experimental 3 (ug/mL)	
0,57	0,576179	0,608187	0,610447	104,9598
1,42	1,359503	1,307932	1,393458	95,32613
4,57	4,530424	4,39997	4,559776	98,39657

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o método mostrou-se preciso, uma vez que não houve variações maiores que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais obtidas nos ensaios realizados (ANVISA, 2003).

6.4.3 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação descrita no item 5.4.6.3. Os valores estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AA

	Intercepção com o eixo Y
Curva 1	-0,94855
Curva 2	-3,67852
Curva 3	0,62166
Desvio Padrão	2,176
Inclinação da curva analítica	86,9925 ^o
Limite de detecção	0,075041 ug/mL

Sendo assim, o método analítico é capaz de detectar a concentração mínima de 0,075041 mg/mL de AA.

6.4.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

O valor calculado segundo a equação descrita no item 5.4.6.4, foi de 0,2483 ug/mL de AA, sendo esta a menor concentração que pode ser determinada pelo método em estudo.

6.4.5 PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrída), Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e Reprodutibilidade (precisão inter-manipulador).

6.4.6 REPETIVIDADE OU PRECISÃO INTRA-CORRIDA

Segundo a metodologia descrita pela ANVISA (2003), os valores do desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5%. Os valores obtidos neste ensaio estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação de AA

	CT (ug/mL)	CE 1 (ug/mL)	CE 2 (ug/mL)	CE 3 (ug/mL)	Desvio padrão	Media	DPR
C1	0,57	0,576179	0,58624	0,56685	0,007918	0,576423	1,373612
C2		0,65472	0,59025	0,60959	0,027013	0,618187	4,369654
C1	1,42	1,214467	1,239473	1,206132	0,014167	1,220024	1,161226
C2		1,26711	1,31223	1,34446	0,031724	1,307933	2,425493
C1	4,57	4,44025	4,44025	4,590286	0,070728	4,490262	1,575134
C2		4,39997	4,39997	4,39997	0	4,39997	0

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no período 1

C2: Corrida no período 2

Nenhuma das concentrações avaliadas apresentou $DPR > 5\%$, portanto, o método apresenta repetitividade.

6.4.7 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA OU PRECISÃO INTER-CORRIDAS

O mesmo procedimento foi realizado para avaliação da precisão intermediária, e os valores de DPR também não foram superiores a 5% (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do AA

	CT (ug/mL)	CE 1 (ug/mL)	CE 2 (ug/mL)	CE 3 (ug/mL)	Desvio padrão	Media	DPR
C1	0,57	0,59988	0,59988	0,63151	0,014911	0,610423	2,442653
C2		0,65472	0,59025	0,60959	0,027013	0,618187	4,369654
C1	1,42	1,39065	1,43810	1,35112	0,035558	1,39329	2,552123
C2		1,26711	1,31223	1,34446	0,031724	1,307933	2,425493
C1	4,57	4,60911	4,53794	4,53003	0,035561	4,559027	0,780017
C2		4,39997	4,39997	4,39997	0	4,39997	0

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no período 1

C2: Corrida no período 2

6.4.8 REPRODUTIBILIDADE

Mais uma vez, os valores de DPR não ultrapassaram 5% (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do AA

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
4,571429	4,52408	4,686709	4,615152	0,069105	4,599342	1,502499
4,000000	4,008548	4,313161	4,105765	0,145654	4,106868	3,546602
1,428571	1,512185	1,408102	1,512185	0,054824	1,465261	3,741576

Desta forma, o método em análise pode ser considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos são menores que 5% (ANVISA, 2003).

6.4.9 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Após a contaminação das soluções de AA com concentrações adequadas do creme base (concentrações que não causaram turvação na amostra), a avaliação da atividade antioxidante da solução foi determinada, e os valores comparados com as concentrações teóricas da solução (concentrações conhecidas no momento do preparo das soluções), determinando-se o DPR (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do AA

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
4,571429	4,679669	4,406225	4,386693	0,139679	4,511004	3,09641
2,857143	2,641317	2,579433	2,579433	0,13181	2,664331	4,947203
0,857143	0,851358	0,80096	0,775761	0,039479	0,821306	4,806845

Os valores de DPR foram inferiores a 5%, portanto o método foi considerado seletivo e específico.

6.4.10 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). Para isto, foi utilizado um solvente (metanol) de fabricante diferente ao utilizado na construção da curva analítica e os resultados comparados para a determinação do DPR (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do AA

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
0,57	0,59988	0,59988	0,63151	0,018262	0,61042	2,991721
1,42	1,39065	1,43810	1,35112	0,043552	1,39329	3,125873
4,57	4,60911	4,53794	4,53003	0,043552	4,55902	0,955302

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

O método também foi considerado robusto.

6.4.11 CURVAS ANALÍTICAS COM SOLVENTES DIFERENTES

Duas novas curvas analíticas foram construídas com solventes diferentes, uma vez que metanol e tampão fosfato (pH 7,4) foram utilizados na avaliação da liberação do AA do cosmético e da permeação e retenção cutâneas.

As curvas estão apresentadas nas Figuras 20 e 21.

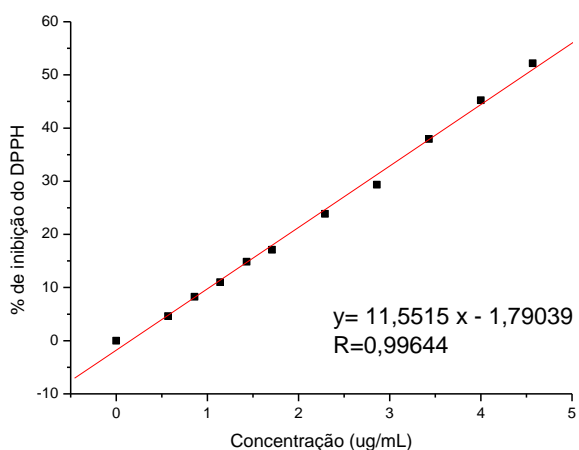


Figura 20. Curva analítica para quantificação do AA utilizando metanol como solvente.

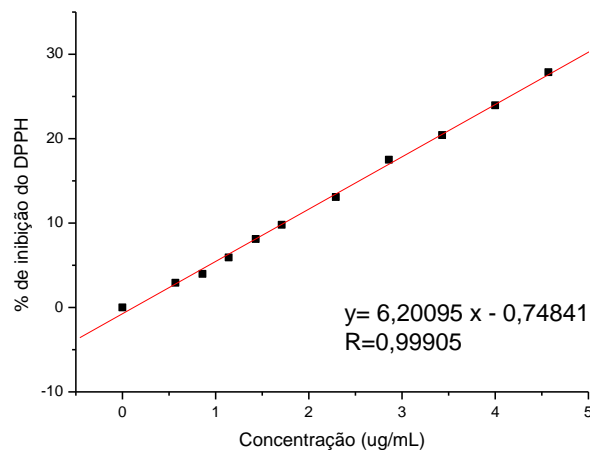


Figura 21. Curva analítica para quantificação de AA utilizando tampão fosfato (pH=7,4) como solvente.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DAS SOLUÇÕES CONTENDO AA ATRAVÉS DO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR)

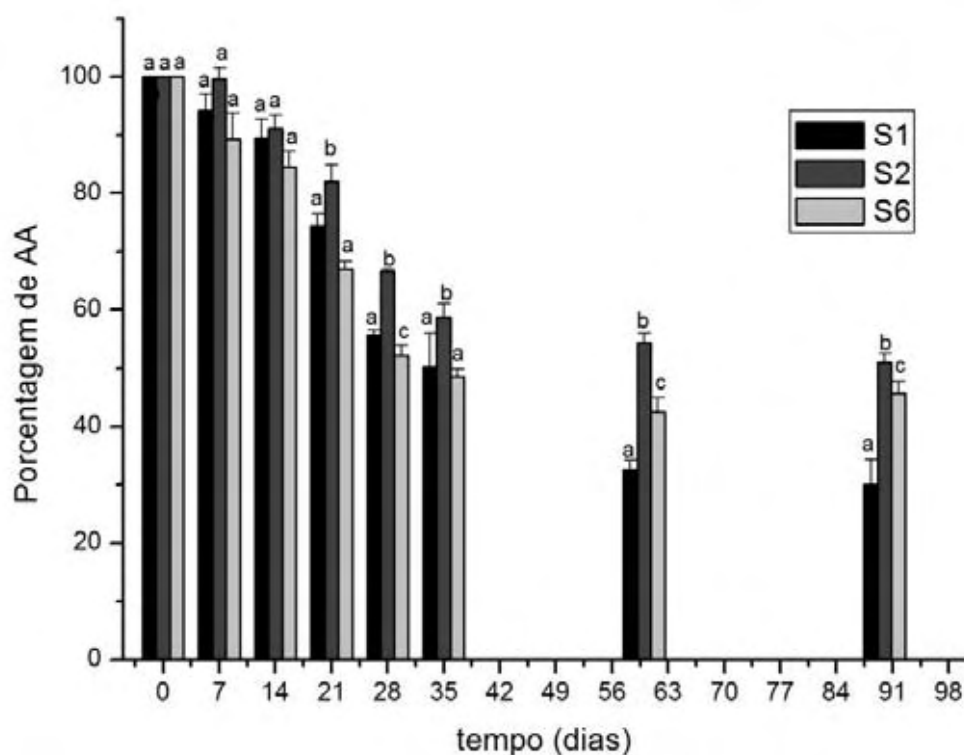
Apenas três sistemas binários foram escolhidos para serem quantificados por esta metodologia, o sistema S1 (100% água), sistema S2 (75% água e 25% propilenoglicol) e sistema S6 (100% propilenoglicol). O sistema S2 foi escolhido para este estudo, pois demonstrou melhores resultados na preservação do AA nas duas metodologias anteriormente estudadas.

Através da Figura 22, observa-se que até o 14^o dia de estocagem, todas elas apresentaram concentração estatisticamente semelhante de AA, porém, a partir do dia 28, o sistema S2, destacou-se em relação às demais, sendo que na última análise, do dia 90, apresentou 51% da concentração inicial de AA.

Yuan e colaboradores em 1998 realizaram um estudo para avaliar a degradação do AA em sistemas aquosos. A concentração de AA foi reduzida drasticamente ao longo dos dias, o que confirma os resultados encontrados ao se avaliar o sistema S1 (100% de água), que apresentou concentração no dia 90 de armazenamento de apenas 29% da concentração inicial de AA, confirmando a instabilidade do AA em soluções aquosas.

O sistema S6 apresentou concentração final de 45,70% da concentração inicial, valor intermediário entre o sistema S1 e sistema S2, mostrando que a estabilidade do AA não é diretamente proporcional à redução da concentração de água no sistema e nem pelo aumento do PG, o que sugere ocorre existir concentrações ótimas para que se tenha um sistema com eficiência para preservar o AA, o que também é afirmado por Wilmott e colaboradores,1991, que relataram que a concentração de água e solventes orgânicos devem respeitar à determinadas proporções, onde o AA não esteja em meio à altas concentrações de água.

Muitos fatores podem interferir na manutenção da atividade deste ativo e, neste caso, observou-se que a proporção 1:4 de PG e água foram as mais adequadas.



a,b,c Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes $p < 0,05$.

Figura 22. Gráfico comparativo da percentagem de AA presentes nas soluções - propilenoglicol/água no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.

Como pode ser observado todos os métodos analíticos aplicados permitiram quantificar o AA presente nas soluções binárias e dentre elas, o sistema S2 apresentou maior poder de estabilização para o AA.

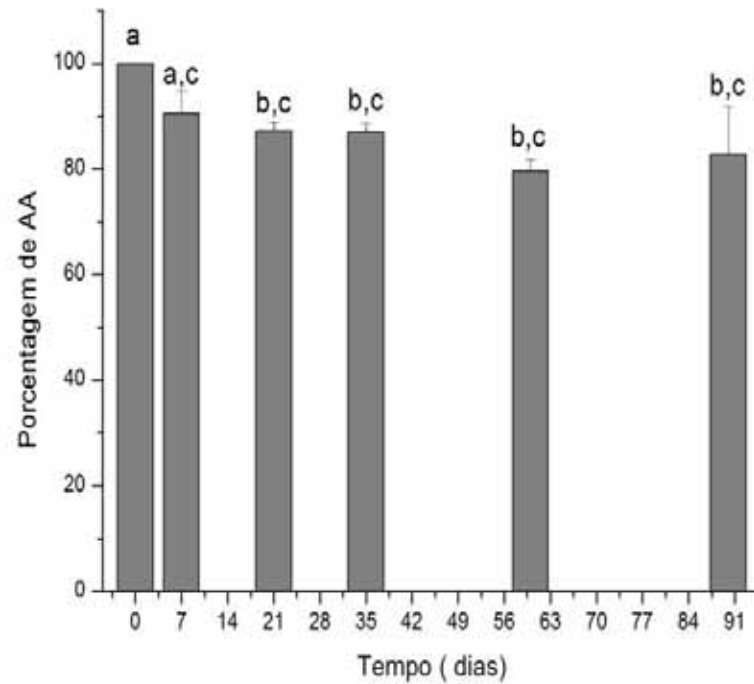
6.5.1 QUANTIFICAÇÃO DA EMULSÃO PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH (MIR)

Através do doseamento da emulsão ao longo do tempo pelo MIR (Figura 23), pôde-se observar que as oscilações na concentração de AA foram menores neste sistema quando comparadas com as soluções, além disso, a concentração de AA no dia 90 foi superior à de todas as soluções, já que a emulsão apresentou 82% da concentração inicial de AA e, o sistema S2, que melhor apresentou resultado nos sistemas binários, foi de apenas 51%.

Para a quantificação da emulsão, os métodos titulométricos apresentaram-se divergentes do MIR, já que os primeiros indicaram maior preservação do AA no sistema S2, do que na emulsão, diferentemente do observado com a utilização do MIR.

Os resultados da quantificação pelo MIR foram mais confiáveis e condizentes com informações encontradas na literatura, já que artigos científicos relatam que o AA pode apresentar eficácia bastante reduzida devido à sua instabilidade físico-química, principalmente em condições aeróbicas, exposto à luz e à altas temperaturas de armazenagem (MAIA et al., 2001; AUSTRIA et al., 1997; GALLARATE et al., 1999). Em soluções aquosas, este ativo oxida-se facilmente a ácido deidro-L-ascóxico e também a outros produtos de degradação (GALLARATE et al., 1999).

A maior preservação do AA na emulsão em relação às soluções pode ser justificada pela sua opacidade, protegendo-a da oxidação devido à exposição à luz solar.



a,b,c Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 23. Gráfico comparativo das percentagem de AA presentes na emulsão no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.

6.6 ALTERAÇÃO DE COR E DEGRADAÇÃO DE AA

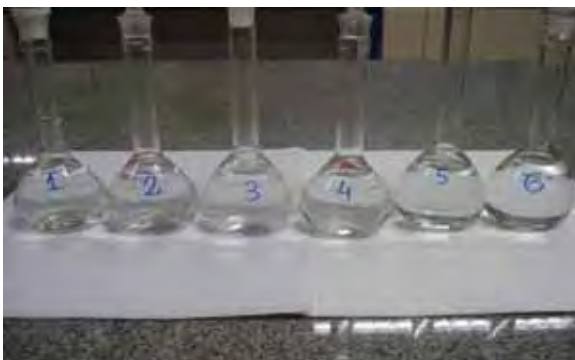


Figura 24. Foto das soluções logo após a manipulação

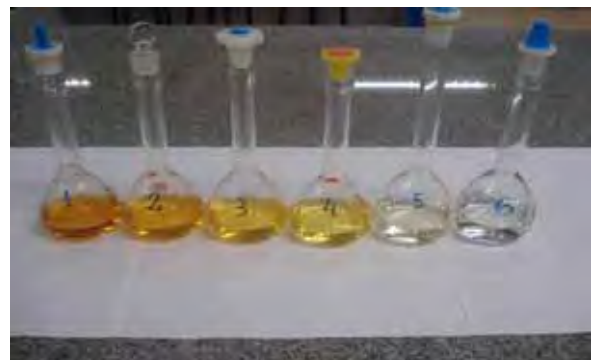


Figura 25. Foto das soluções após 28 dias

Através das Figuras 24 e 25 é possível notar que após 28 dias de armazenamento os sistemas binários, sofreram alteração de cor, sendo que, quanto

maior a concentração de água nos sistemas, mais intensa foi a coloração produzida. Pode-se observar também que em presença de propilenoglicol e na ausência de água, em concordância com a solução S6, composta somente por propilenoglicol, não apresentou coloração apesar dos resultados analíticos indicarem degradação do AA. Tal situação explica-se pelo fato do sistema em questão não ter permitido que o AA sofresse degradação completa até o produto colorido denominado furfural. A figura 26 representa a sequência oxidativa sofrida pelo AA. (Wilmott et al., 1991) .



Figura 26. Reação de oxidação não enzimático do AA.

6.7 SISTEMAS CONTENDO AGREGADOS SUPRA MOLECULARES

O diagrama de fase foi construído para a obtenção de sistemas para incorporação do AA e, posteriormente foram quantificados pelo MIR, para que se avaliasse a estabilidade química do AA. O diagrama abaixo (Figuras 27 e 28) representa as 36 formulações obtidas.

A partir do diagrama de fases desenvolvido, foram escolhidas três formulações P2, P5 e P15, correspondentes a dois sistemas líquidos cristalinos com indicativo de fase lamelar (P2), e fase hexagonal (P5) e um sistema com indicativo de microemulsão (P15). A tabela 10 apresenta a composição percentual de tais sistemas.

Tabela 10. Composição percentual das formulações propostas

	P2	P5	P15
Dicaprylyl Carbonate	10%	20%	50%
Polysorbate-80	70%	60%	40%
Water	20%	20%	10%

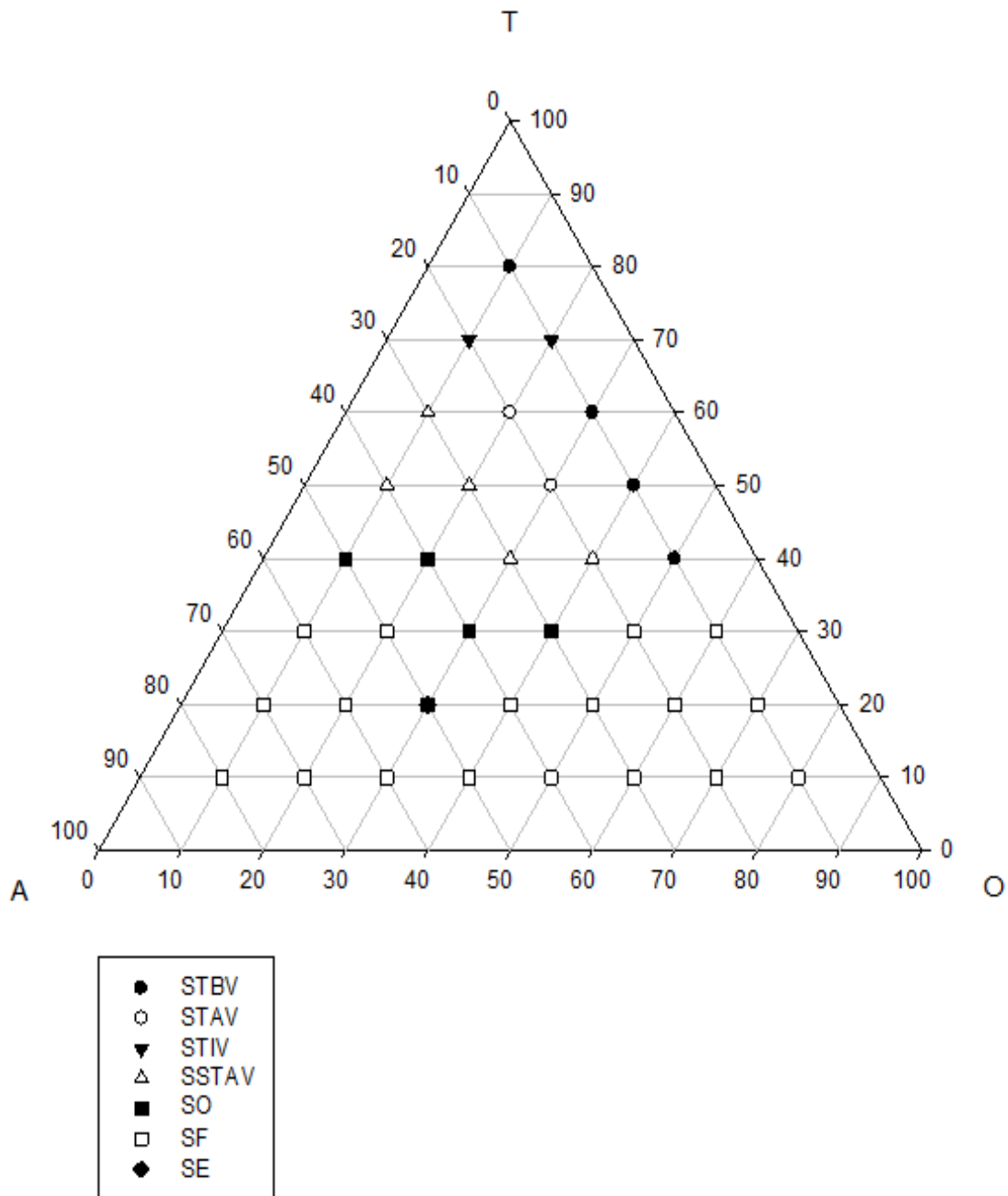
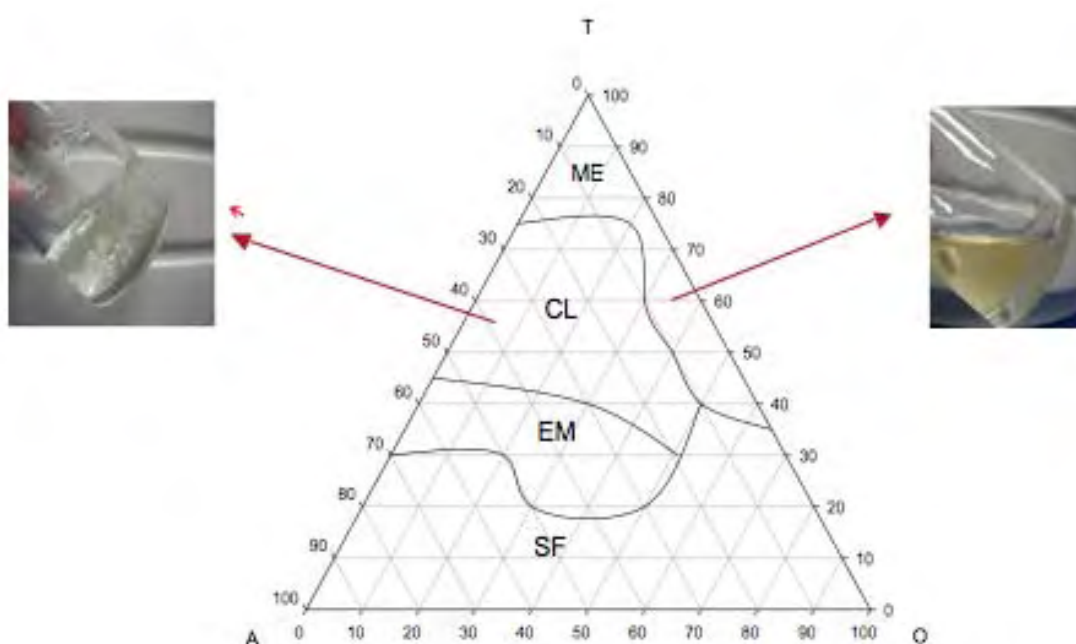


Figura 27. Diagrama de fases com a classificação do sistemas obtidos. Polysorbate 80 (tensoativo), água (fase aquosa) e Dicaprylyl Carbonate (fase oleosa)



**Figura 28. Diagrama de fases com classificação das áreas encontradas após avaliação por microscopia de luz polarizada. Polysorbate 80 (tensoativo), água (fase aquosa) e Dicaprylyl Carbonate (fase oleosa).
ME=microemulsão; CL=sistema líquido cristalino; EM=emulsão; SF=separação de fases**

Após avaliação dos sistemas obtidos através de microscopia de luz polarizada e classificação dos mesmos, foram escolhidas três deles com diferentes características para a incorporação do AA. Tais sistemas formam, então, denominados formulação P2, com indicativo de fase lamelar (Figura 29); formulação P5, com indicação de fase hexagonal (Figura 30); e formulação P15, com indicação de microemulsão (figura 31). O círculo branco na figura 25 é uma bolha de ar.

Em relação à composição, a formulação P2, foi preparada contendo 70% de tensoativo, 20% de água e 10% de Dicaprilil Carbonato; a formulação P5, contendo 60% de tensoativo, 20% de água e 20% de Dicaprilil Carbonato e a formulação P15, contendo 40% de tensoativo, 10% de água e 50% de Dicaprilil Carbonato.

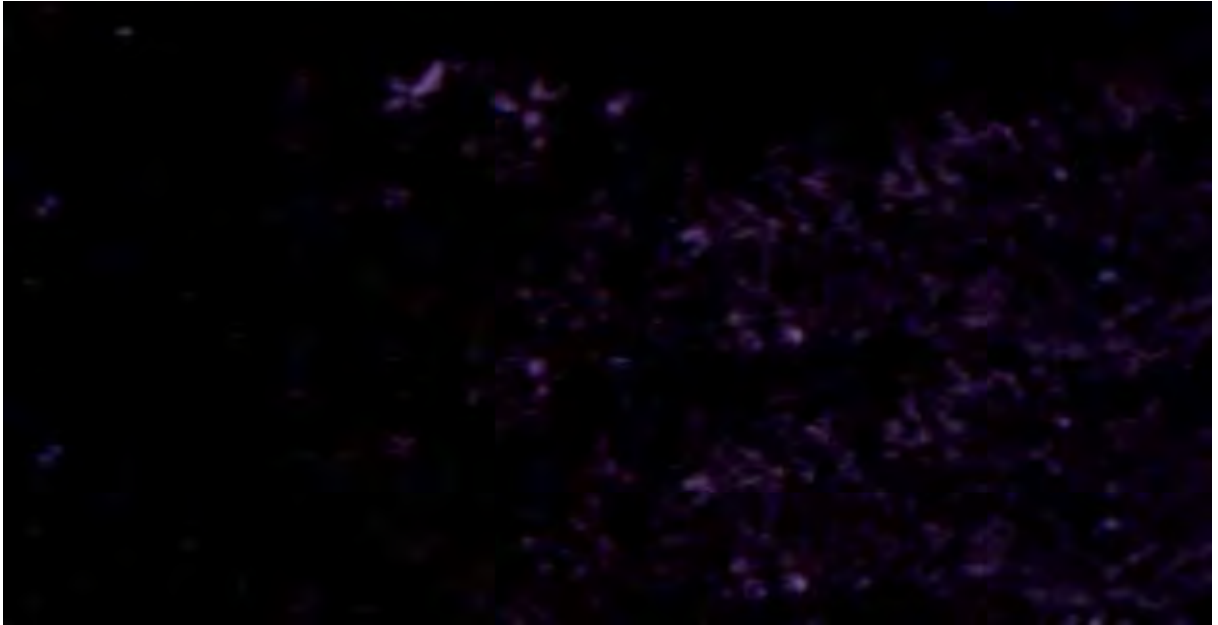


Figura 29. Fotomicrografia apresentando cruces de Malta, característica de fase lamelar

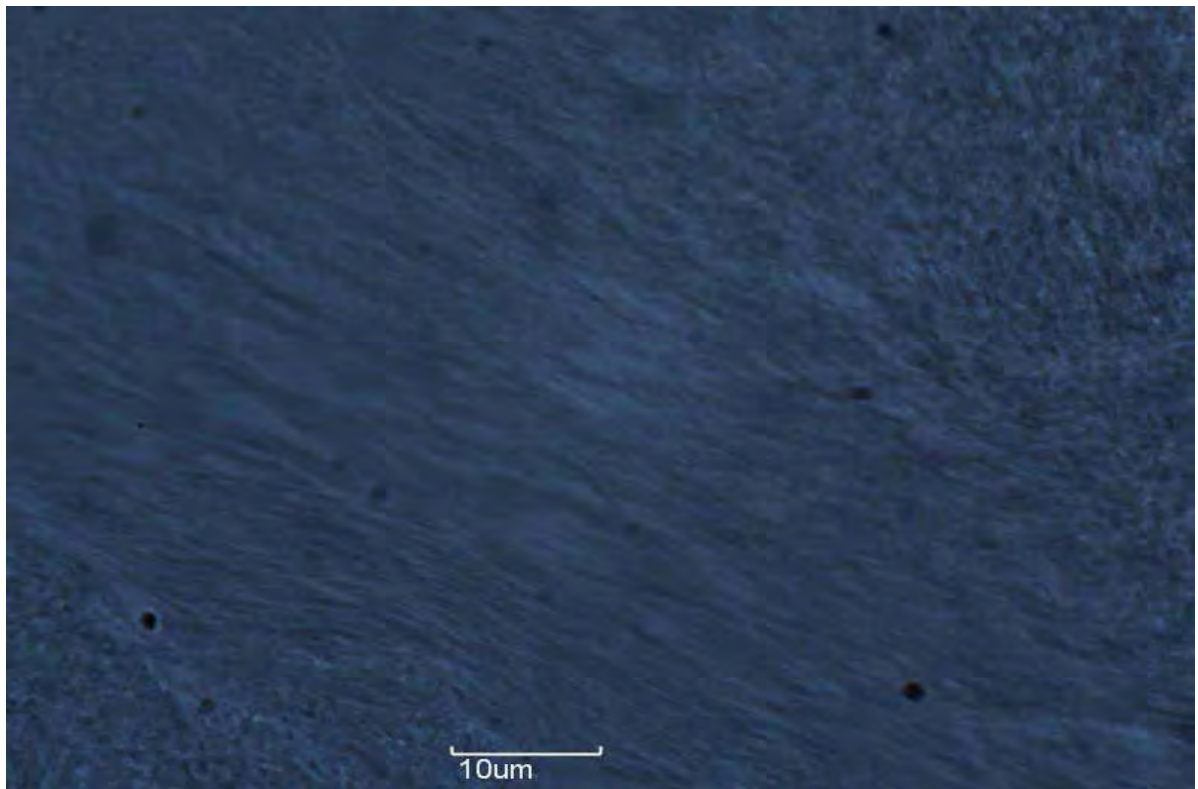


Figura 30. A fotomicrografia com a presença de estrias, característica de fase hexagonal



Figura 31. Fotomicrografia representativa de formulação do tipo microemulsão com campo escuro

6.7.1 QUANTIFICAÇÃO PELO MIR

A figura 32 representa a quantificação das formulações P2, P5 e P15 após um período de 90 dias e em sua análise nota-se que houve um decréscimo significativo na concentração de AA em todos os sistemas avaliados.

A formulação que mais preservou o AA foi o sistema P2, com 39,31% no dia 90 da quantificação contra 28,14% do sistema P15 e, apenas 6,64% no sistema P5. Essa brusca queda na concentração de AA nos sistemas avaliados pode ser devida a transparência apresentadas pelos sistemas.

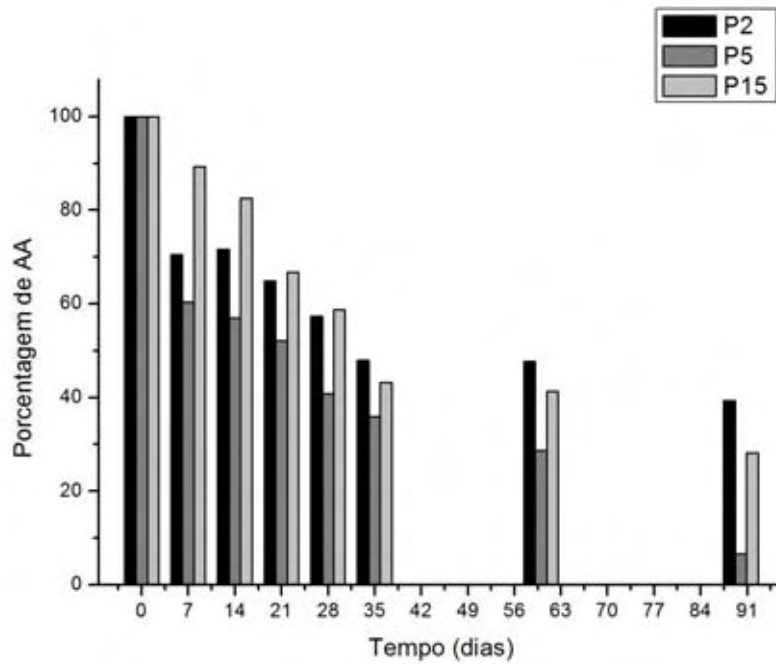
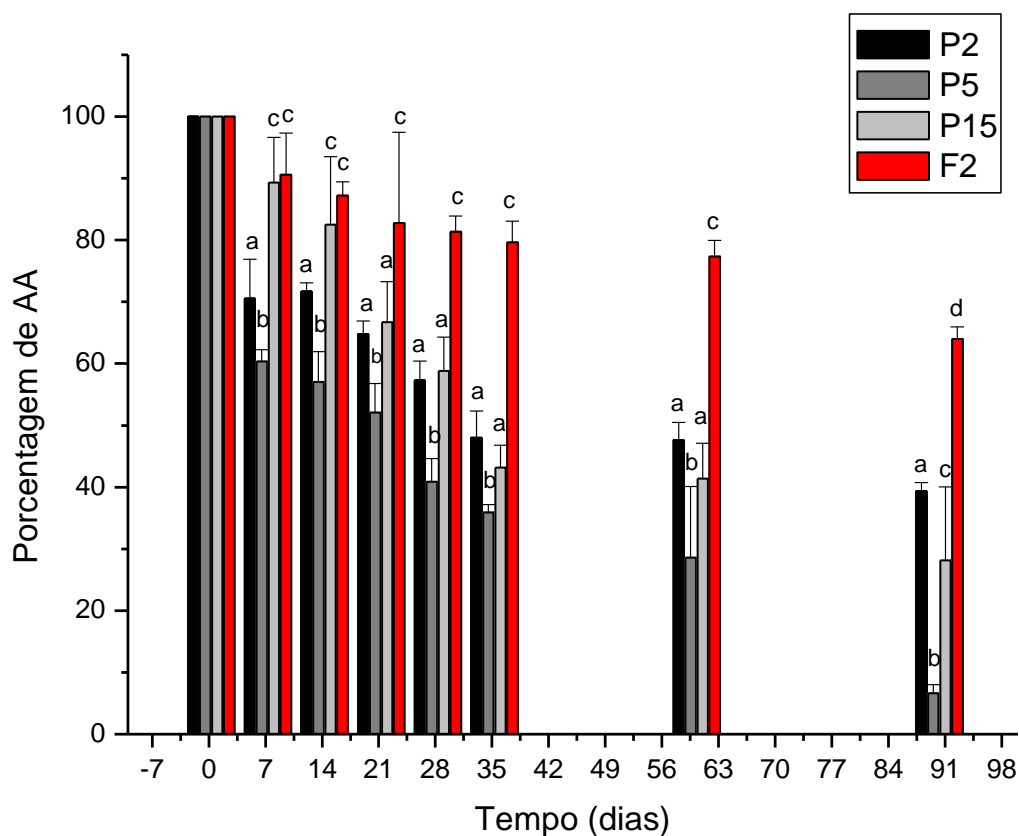


Figura 32. Gráfico comparativo das percentagem de AA presentes nos sistemas P2, P5 e P15 no mesmo dia, e durante 90 dias, avaliados pelo método analítico MIR.

A figura 33, abaixo mostra a comparação entre os sistemas P2, P5 e P15 em relação à Emulsão (F2).



^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). As amostras foram comparadas apenas em cada dia de estudo isoladamente, não indicando, portanto, se a quantidade de AA determinada no dia 0 é estatisticamente igual à do dia 90.

Figura 33. Gráfico comparativo das percentagens de AA presentes nos sistemas ou formulações P2, P5, P15, comparadas à emulsão (F2) avaliados pelo método analítico MIR.

Uma análise superficial da figura 33 demonstra de forma bastante evidente que a emulsão se mostrou mais estável em relação aos demais sistemas. No dia 90 da quantificação a concentração de AA na emulsão, em relação ao dia 0 (zero) foi de 63,98% e tal desempenho pode ser devido à opacidade do sistema.

Devido a estes resultados apenas a emulsão F2, será utilizada nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea.

6.8 ESTUDO DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO

O sistema escolhido para os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea epiderme/derme do AA foi a emulsão por ter apresentando melhores resultados na manutenção da estabilidade química do AA ao longo do tempo.

A escolha de um sistema adequado para incorporação de ativos é de fundamental importância, pois, o sistema de escolha pode auxiliar na manutenção da estabilidade do ativo, auxiliar na disponibilidade do ativo no local de aplicação. O veículo tem influência na liberação, permeação e retenção do fármaco, tendo um papel importante para sistemas de uso tópico (FLORENSE & ATWOOD, 2003).

As emulsões são os veículos mais usuais de sistemas de liberação em produtos de uso tópico. Por meio destas, é possível veicular ampla gama de substâncias que são liberadas de maneira rápida e conveniente (SCHUELLER, ROMANOWSKI, 2000)

Para a quantificação do AA, que foi liberado da emulsão, que foi permeado e que ficou retido na epiderme/derme foi utilizado como ferramenta o método analítico MIR. Para isso, foram utilizadas as curvas analíticas construídas com a concentração de AA versus percentagem de inibição do radical DPPH, tendo como solventes o metanol e o tampão fosfato (pH=7,4). Isso porque na avaliação da liberação do AA da emulsão e da permeação cutânea, o meio receptor utilizado foi o tampão fosfato; já na avaliação da retenção do AA contido na emulsão na epiderme/derme, a membrana biológica utilizada é mergulhada em metanol e a solução resultante é utilizada para a quantificação.

6.8.1 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DO AA CONTIDO NA EMULSÃO

Para a avaliação da liberação do AA contido na emulsão, a fase receptora foi coletada das células de Franz e, em seguida submetida à avaliação de quantificação

do AA pelo MIR. A partir dos valores obtidos, a concentração de AA na solução receptora foi calculada. Através destes valores, foi construído o gráfico da figura 34.

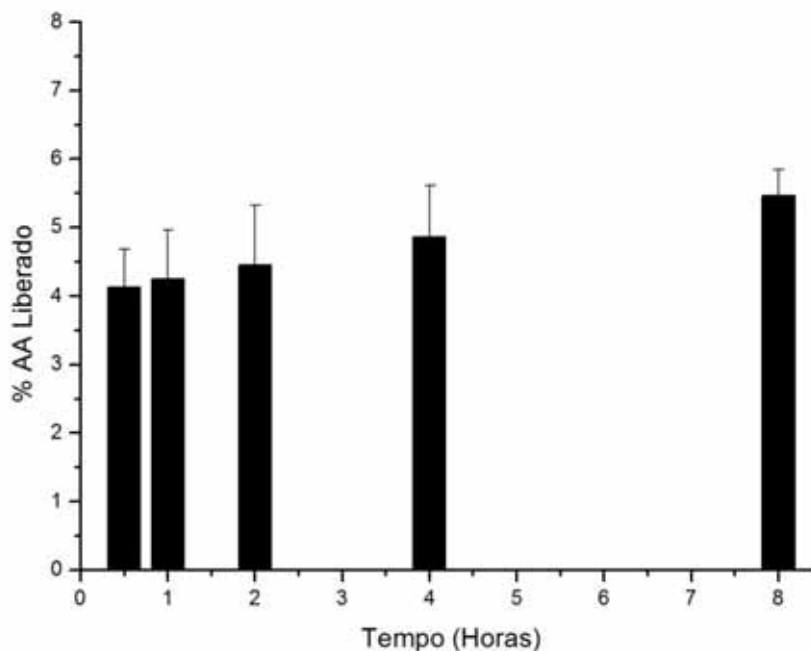


Figura 34. Porcentagem de AA liberado pela emulsão através das membrana sintética nos tempos de 1/2, 1, 2, 4 e 8 horas

Os resultados sugerem que existe um aumento gradual na concentração de AA com o decorrer do tempo, no entanto a quantidade de AA liberada é baixa em relação à quantidade total. Tal fato pode ser explicado por uma das condições experimentais, o pH= 7,4. A literatura demonstra que a eficiência de liberação e permeação pode ser prejudicadas quando o AA encontra-se em condições de pH próximo a neutralidade. (Jong et al., 2004).

Foi avaliado também, o perfil cinético de liberação do AA da emulsão. Para isto, foram aplicados três modelos matemáticos para interpretação da cinética de liberação: zero ordem; primeira ordem e modelo de Higuchi. Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados da liberação de acordo com o tempo e porcentagem de AA liberado. O modelo de zero ordem representa a relação entre a quantidade de AA liberada versus tempo; o modelo de primeira ordem, o log da concentração de AA liberado *versus* o tempo e o modelo de Higuchi representa a

quantidade de AA liberado *versus* a raiz quadrada do tempo. Os modelos foram plotados nos graficos demonstrados nas figuras de 35 a 37.

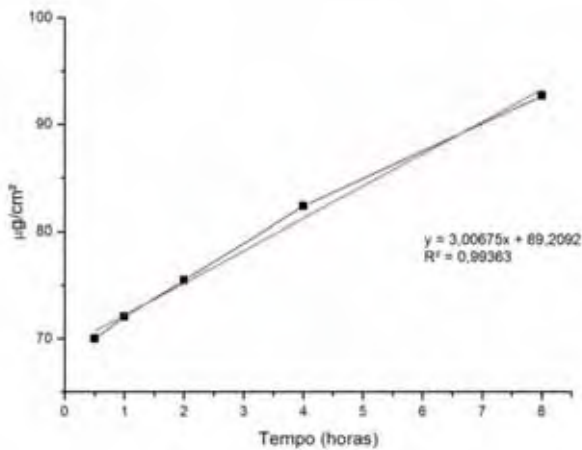


Figura 35. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de zero ordem.

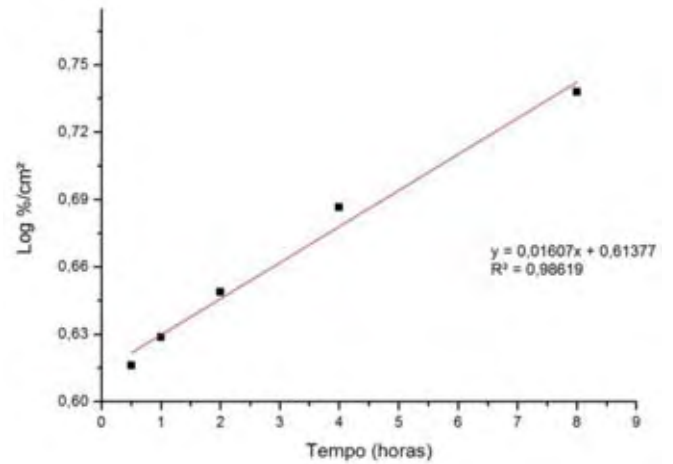


Figura 36. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de primeira ordem.

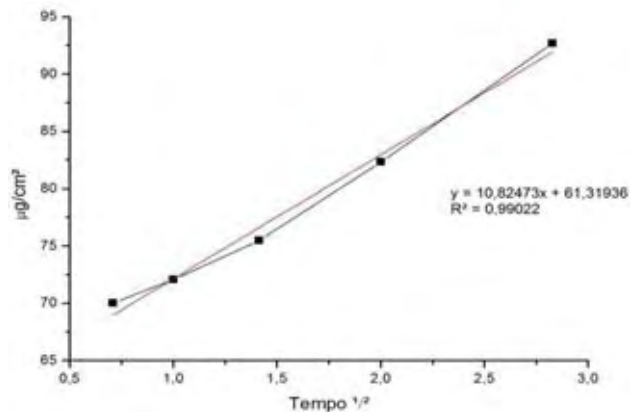


Figura 37. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da emulsão contendo AA de acordo com o modelo de Higuchi.

O índice de correlação (R^2) foi utilizado para estabelecer qual é o modelo mais adequado. O modelo de escolha foi aquele que apresentou o maior valor de R^2 . Os valores calculados encontram-se representados na tabela 11.

Tabela 11. Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação da emulsão contendo AA

<i>Modelos</i>	<i>Emulsão com AA</i>
Zero ordem	0,99363
Primeira ordem	0,98619
Higuchi	0,99022

Segundo os dados da tabela 11, a emulsão contendo AA, segue o modelo de liberação de zero ordem, onde a liberação ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração do ativo (MONTEIRO et al., 2007)

6.8.2 AVALIAÇÃO DA PERMEÇÃO CUTÂNEA DO AA CONTIDO NA EMULSÃO

Na avaliação da permeação cutânea, a fase receptora foi coletada e teve seu teor de AA quantificado (Figura 38).

Observou-se que com o decorrer do tempo houve aumento da quantidade de AA permeada, o que é desejado para um produto com características antienvhecimento.

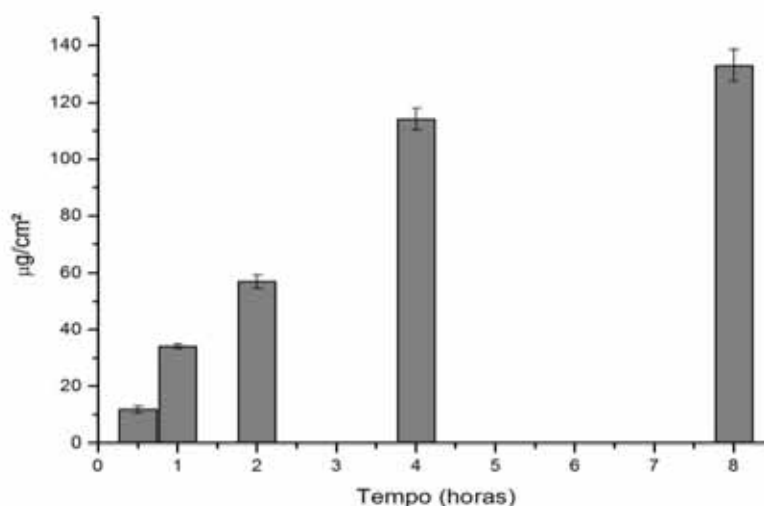


Figura 38. Concentração em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AA permeada através da membrana biológica, a partir da emulsão, analisadas no período de 8 horas empregando-se como técnica analítica o MIR.

6.8.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO NO ESTRATO CÓRNEO, EPIDERME E DERME DO AA CONTIDO NA EMULSÃO

A quantidade de AA retida na epiderme, derme e estrato córneo foi determinada (Figura 39) e observou-se que com o passar do tempo, tais concentrações apresentaram decréscimo, em adequada concordância com os resultados obtidos durante os ensaios de permeação que apresentou concentrações crescentes em relação ao tempo. Outra observação importante a ser considerada é a demonstração de que a concentração de AA, retida foi bem maior que a permeada, o que é interessante, já que o AA é um importante fator na síntese de colágeno (WILMOTT et al., 1991).

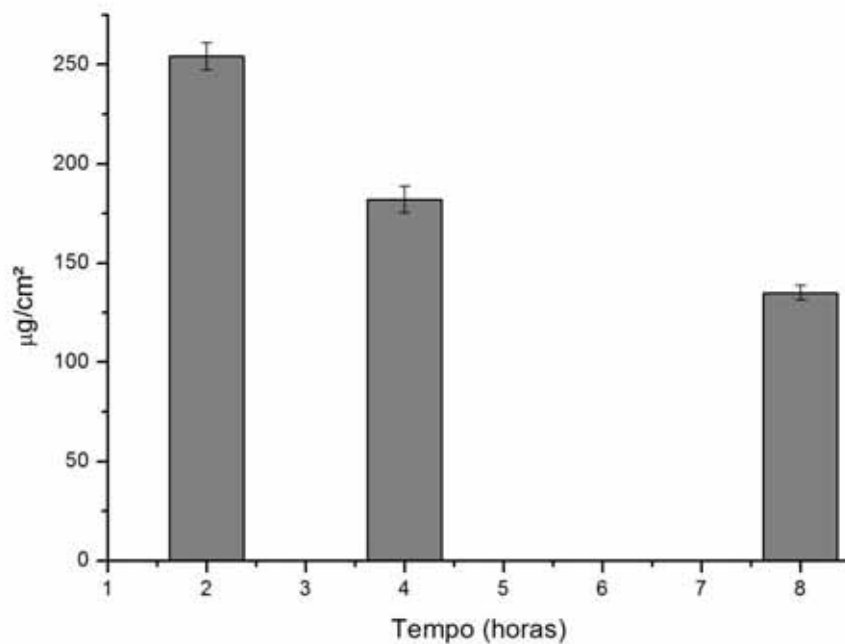


Figura 39. Concentração em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AA retido no estrato córneo, epiderme e derme da membrana biológica, a partir da emulsão, analisadas no período de 8 horas empregando-se como técnica analítica o MIR.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este estudo mostraram que é possível o desenvolvimento de sistemas que auxiliem na manutenção da estabilidade de ativos instáveis como o AA.

Os métodos utilizados para a quantificação do AA mostraram-se efetivos para determinados sistemas, ou seja, os métodos titulométricos empregados para o doseamento do AA, foram efetivos apenas para os sistemas intitulados de soluções binárias (propilenoglicol/água) e apresentaram divergências nos resultados obtidos durante a quantificação do AA, presente no sistema emulsionado (F2). O método que utiliza o radical DPPH, denominado MIR, foi validado de acordo com normas preconizadas pela ANVISA e, mostrou-se efetivo para a análise de todos os sistemas, exceto para os sistemas que continham o PPG-5 Ceteth-20, como tensoativo, no entanto, nenhum dos outros métodos utilizados apresentou eficiência para análise dos sistemas contendo este tensoativo.

Através da microscopia de luz polarizada, os sistemas contendo agregados supramoleculares foram avaliados e, mostraram-se inferiores aos demais sistemas, o que não era esperado, já que as características físico-químicas desses sistemas levam a acreditar que estes podem ser mais eficientes na estabilização de ativos.

O sistema que mais auxiliou na manutenção do AA, ao longo de 90 dias, foi a emulsão F2, em comparação às soluções, microemulsões e sistemas líquido cristalinos, o que pode ser justificado por sua opacidade, o que pode proteger o AA da oxidação pela exposição à luz solar.

A emulsão contendo AA foi submetida a ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, onde segue o modelo de liberação de zero ordem, em que a liberação ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração do ativo, baixa taxa de permeação e alta retenção na pele, o que é interessante para um produto de uso tópico, já que o AA estimula a proliferação de colágeno na derme.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. **II Caderno de Tendências, Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**, 2011. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/novo-wp/wp-content/uploads/2011/08/caderno_tendencias1.pdf. Acesso em: Julho, 2012

AVON PRODUCTS, INC., NEW YORK, N.Y. WILMOTT, M. J.; ZNAIDEN, P. A. **COSMETIC PREPARATION INCORPORATING STABILIZED ASCORBIC ACID**. U.S PATENT NUMBER 4,983,382 - JAN. 08. 1981.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8° ed, São Paulo: **Artmed**, 775 p, 2007.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em: Julho, 2012.

ANVISA. **Resolução-RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: Julho, 2012.

ARAÚJO, J. *Biologia*, disponível em: www.dbio.uervora.pt. (Acesso em 05/07/2012)

AUSTRIA, R.; SEMENZATO, A.; BETTERO, A. Stability of Vitamin C Derivatives in Solution and Topical Formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, p. 795-801, 1997.

BARAKAT, M. Z.; EL-WAHAB, M. F. A.; EL-SADR, M. M. Action of NBromosuccinimide on Ascorbic Acid- New Titrimetric Method for Estimation of Vitamin C. **Anal. Chem.**, v.27, n.4, p.536–540,1955.

BARAKAT, M. Z.; SHEHAB, S.K.; DARWISH, N, EL-ZOHEIRY. A. A New Titrimetric For the Determination of Vitamin C. **Anal. BioChemistry.**, v.53, p. 245-251,1973.

BREUER, M.M. Cosmetics emulsions. In: BECHER, P. (ed.) **Encyclopedia of emulsions technology**. New York, Marcel Dekker, 1985, v. 2, p. 385-424.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T., COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. **J. Control. Rel., Arlington**, v.60, p.67-76, 1999.

CHIARI, B. G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L: 2011. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CHIEN, Y. W. Novel Drug Delivery Systems. 2° ed, New York: Marcel Dekker, Inc, p. 300-375, 2005.

CORREA, M. A. **Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica**. [Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]. São Paulo, 1997 146p.

Danielsson and B. Lindman, The definition of a microemulsion. **Colloids Surf.** 3 (1981), pp. 391–392.

DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotion. In: **Newburguer's manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, Senzel, AJ, 1977. p.32.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, Baltimore, v.43, n.2, p.460-472, 1983

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. **Handkook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.7, p.195-240.

FARMACOPEIA brasileira. São Paulo: Atheneu, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Edusp, 2003. 732p.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. [Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]. Ribeirão Preto, 2007.

FORSLIND, B.; ENGSTRÖM, S.; ENGBLOM, J.; NORLÉN, L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. **Journal of Dermatological Science**. Sweden, v. 14, n. 2, p. 115-125, 1997.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J. Invest. Dermatol.** v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

FRANZ, T. J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. **Curr. Probl. Dermatol.** v. 7, p. 58-68, 1978.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On the Stability of Ascorbic Acid in Emulsified Systems for Topical and Cosmetic Use. **Int. J. Pharm.**, v. 188, p. 233-241, 1999.

GAREWAL H. S., DIPLOCK, A. T. How 'safe' Are Antioxidant Vitamins? **Drug Safety, New Zealand**, v. 13, n. 1, p. 8-14, 1995

GENNARO, A. R. **Remington the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GOLDSMITH, L. A My organ is bigger than your organ. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.126, p.301-302, 1990.

HADSHIEW, M. I.; ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A. Skin Aging and Photoaging: The Role of DNA Damage and Repair. **American Journal of Contact Dermatitis**, v11, N 1, 2000: pp 19-25

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

Handbook of Pharmaceutical Excipients, fifth edition, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, UK, 2006.

HOOLEGAARD, A., MOLLGAARD, B., 1985. Dermal drug delivery-improvement by choice of vehicle or drug derivative. **J. Controlled Release** 2, 111–120.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap.16, p.299-332.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **REV. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JATO, J. L. V. **Tecnologia Farmaceutica**: Aspectos Fundamentais de los Sistemas farmacéuticos y operaciones basicas, Madrid: Editorial Sintesis. v. I, p. 1-362, 1997.

JONG-SUK, L.; JIN-WOONG, K.; SANG-HOON, H.; IH-SEOP, C.; HAK-HEE, K.; OK-SUB L.; SEONG-GEUN, O.; KYUNG-DO, S.;. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. **J. Cosmet. Sci.** v. 55, p. 1-2, 2004.

KALLIOINEN, S.; HELENIUS, K.; YLIRUUSI, J. Influence of storage time and temperature on the stability of some emulsion creams. **Pharmazie**, v. 49, p. 500-505, 1994.

KAUR, P. I.; KAPILA, M. AGRAWAL, R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. **Ageing Research Reviews** 6. p. 271–288. 2007.

LABA, D. The flow of cosmetics and toiletries. In: LABA, D. **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries**. New York, Marcel Dekker, 1993. cap. 1, p. 1-8, 35-54.

LASHMAR, U.T.; BEESLEY, J.; Correlation of Rheological Properties of an Oil in Water Emulsion with Manufacturing Procedures and Stability. **Int. Journ. of Pharmaceutics**. v. 91, p 59-67. 1993.

LEITE,H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. Medfarma, 1 ed., p.92-93, 2004.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HAFGRAFT, J.; HUMBERT, Ph. Comparidon of Franz cells and midrodialysis for assessing salilylic acid penetration through human skin. **Interantional Journal of Pharmaceutics**. France, v. 269, n. 2, p. 323-328, 2003.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reversehexagonal liquid crystals: Drugdelivery and crystallization applications. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 356, n. 2, p. 375–386, 2011.

LORAY Z. Vitamina C: Antioxidante e Protetor de Colágeno. **Revista de Cosmiatria e Medicina Estética**, São Paulo, v. 7, n. 4, p.15-17, 1999.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R. **Formulário Dermocosmético**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade ,1999. v. 2, p.37-38.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; SILVA G.M. Ascorbic Acid and derivates in Cosmetic Formulations. **Cosmetics & Toiletries**, Oak Park, v.115, n.6, p.59-62, 2000.

MAIA, A. M.; ROBLES, M. V.; DE PAOLA, V.; RIBEIRO, M. E.; CONSIGLIERI, V. O. Ação das vitaminas antioxidantes em cosméticos. **Revista Racine**, v. 65, p. 52-60, 2001.

MARQUELE, F.D.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S.; LARA, M.G.; FONSECA, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v.41, p.461–468, 2006.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY H.N.; 2004. Toxic effect of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 195, 298–308.

MENON, K. G.; DRYER, L.; KALAFSKY, R. Approaches to the Development of Cosmetic Products to Counter the Effects of Skin Aging. **Skin Aging Handbook**. p. 265-290. 2009;

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v.15, p.127–130, 2001.

MINER, P. E. Emulsion Rheology – Creams and Lotions. In: LABA D. **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries**. New York, Marcel Dekker, 1993. cap. 9, p. 313-370.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, L.M.; SOUZA, A.E.; GIANOTTO, E.A.S.; NERY, M.M.F.; DUARTE, J.C.; FREITAS, O.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M.M. Comprimidos matriciais preparados com hidroxipropilmetilcelulose e pectina contendo quercetina para liberação cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179-184, 2007.

MOSTEFA, N.M.; SADOK, A. H.; SABRI, N & HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 28(3): 211-218, 2006.

MULLER-GOYAMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European J. of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**. v. 58 p.343-356, 2004.

NAÉ, H. N. Introduction to Rheology. In: LABA, D. **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries**. New York, Marcel Dekker, 1993. cap. 3, p. 35-54.

NETO, F.A.M.; SALINAS, S.R.A. The Physics of Lyotropic Liquid Crystals, Phase Transitions and Structural Properties. (Monographs on Physics and Chemistry of Materials 62, Oxford Science Publications), **Oxford University Press** (2005).

NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.687-692, 1992.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**, n.28, Paris, 2004.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1., p131-138, 2004.

OCHIAIA, Y.; KABURAGIA, S.; OBAYASHIA, K.; UJIEA, N.; HASHIMOTOA, S.; OKANOYA, Y.; MASAKIA, H.; ICHIHASHIB, I.; SAKURAIC, H. A new lipophilic pro-vitamin C, tetra-isopalmitoyl ascorbic acid (VC-IP), prevents UV-induced skin pigmentation through its anti-oxidative properties. **Journal of Dermatological Science**. Volume 44, Issue 1, p37-44 2006.

PADH, H. Vitamin C: never insights into its biochemical functions. **Nutrition Reviews**, v.49, n.3, p.65-70, 1991.

PANCHAGNULA, R., SALVE, P. S., THOMAS, N. S., JAIN, A. K., RAMARAO, P. Transdermal delivery of naloxone: effect of water, propylenoglycol, ethanol and binary combinations on permeations through rat skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.95, p. 95-105, 2001.

PAOLA, M.V.R.V.; RIBEIRO, M.E.; YAMAMOTO,J.K. Multifuncionalidade das Vitaminas. O Poder das Vitaminas nos Produtos Cosméticos. **Cosm. Toil.**, v.10, n.4, p.44-54, 1998.

PÓVOA FILHO, H. Antioxidantes. In: **Radicais Livres: em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, p.211-246, 1995.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p.600.

RANDAU, K.P.; MEIRA, J.L.; FARIAS BRAGA, J.M.; MONTEIRO, D.B.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) - Matéria-Prima. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.

SHAH, J.S.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Arlington, v. 47 p. 229-250, 2001

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosmet.Toiletries.**, v. 12, p. 71-74, 2000

SHARMA, M.K & SHAH, D. Introduction to Macro and Microemulsions. In: SHAH, D.O. (ed.). **Macro and microemulsions theory and applications**. Washington, American Chemical Society. 1985. chap. 1.

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

SMITH, E.W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. **Use of emulsions as topical drug delivery systems**. In: NIEDELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*, New York, Marcel Dekker, 2000. p. 259-269

T.P. Hoar and J. Schulman, Transparent water in oil dispersions: oleopathic hydromicelle. **Nature (Lond.)**, **152** (1943), pp. 102–103.

TAGAMI, H. Functional Characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. **Arch Dermatol Res**, v. 300, p. s1-s6, 2008.

TANAKA, D.L. 2007. **Influência da desidratação por spray dryer sobre o teor de ácido ascórbico no suco de acerola (Malpighia spp)**. Dissertação (mestrato). Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP- Araraquara.

TSUKAMOTO, K.; JACKSON, I.J.; URABE, K. A second tyrosinase- related protein. TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOP Achrome tautomerases. **EMBO J**. p. 519-26, 1992.

TSUMURA, F., OHSAKO, Y., HARAGUCHI, Y., KUMAGAI, H., ISHI, K. Rapid enzymatic assay for ascorbic acid in various foods using peroxidase. **J. Food Sci.**, v.58, n.3, p.619-23, 1993.

ULRICH, C.; SCHMOOK, T.; SACHSE, M.M.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E.; 2004. Comparative epidemiology and pathogenic factors for non-melanoma skin cancer in organ transplant patients. **Dermatol. Surg**. 30, 622–627.

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G.; PLESSIS, J. Du; GOOSEN, C. A comparative study of an in situ adapted diffusion cell and in vitro Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences. South Africa**, v. 13, n. 2, p. 169- 177, 2001.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, p.209-240, 1997.

WULFf, H.C.; SANDBY-MOLLER, J., KOBAYASI, T.; GNIADOCKI, R.; 2004. Skin aging and natural photoprotection. **Micron** **35**, 185–191.

YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Skin aging: Postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clinics in Geriatric Medicine.*, Volume 17, v4, p. 617-630, 2001.

YAMANE, M. A., WILLIAMS, A. C., BARRY, B. W. Terpene penetration enhancers in polyleneglycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v.47, p. 978-989, 1995.

YUAN, P.; CHEN, F. **Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution**. *J. Agric. Food Chem.* v. 46 (12), p. 5078–5082, 1998.

ZAMBON, A. P. B. **Influência da Associação de Filtros Solares Sobre a Estabilidade, Liberação, Permeação e Retenção Cutânea do p-Metoxicinamato de Octila em Formulações Fotoprotetoras**: 2011. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ZERDIN, K.; ROONEY, M.L.; VERMUE, J. The vitamin C content orange juice packed in an oxygen scavenger material. **Food Chem.**, v. 82, p. 387-389, 2003.