

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**Validação de metodologia analítica para quantificação de
nicotinamida e ácido ascórbico em emulsão**

CAMILA JANDIRA MARTINS

Araraquara – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA

Validação de metodologia analítica para quantificação de nicotinamida e ácido ascórbico em emulsão

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica

Graduanda: Camila Jandira Martins
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa
Co-orientadora: Caroline Magnani Spagnol

Araraquara – SP
2016

Agradecimentos

Aos meus pais, **Milton e Lucinéia**, por não medirem esforços para que eu percorresse meu caminho, por todo o apoio, carinho e dedicação, esta conquista é para vocês.

À toda minha família, pela torcida e carinho.

Ao meu orientador, professor doutor **Marcos Antonio Corrêa**, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela atenção e por todo o conhecimento oferecido.

À minha co-orientadora, **Caroline Magnani Spagnol**, por ter me ajudado incansavelmente, pela paciência, incentivo, conhecimento e disponibilidade durante todo o período de estágio.

Aos amigos que fiz nestes anos, por todas as alegrias, carinho e parceria, em especial à **Bia, Danilo, Raissa e Luiz Fernando**, vocês foram essenciais para que esta jornada fosse percorrida.

À todos os funcionários da FcFar.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	A pele	13
2.2	Estresse oxidativo e o envelhecimento precoce	15
2.3	Ácido ascórbico.....	16
2.4	Nicotinamida	19
2.5	Validação de métodos analíticos	20
2.5.1.	Especificidade e Seletividade	22
2.5.2.	Linearidade.....	22
2.5.3.	Limite de detecção e de quantificação	23
2.5.4.	Precisão	23
2.5.5.	Exatidão.....	24
2.5.6.	Robustez	24
3	OBJETIVOS.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Materiais.....	26
4.1.1	Materiais.....	26
4.1.2	Equipamentos	26
4.2	Métodos.....	26
4.2.1	Desenvolvimento e preparo da formulação	26
4.2.2	Desenvolvimento do método analítico para quantificação de AA e NIC em emulsão.....	28
4.2.3.	Validação do método analítico	35
4.2.3.1.	Especificidade e Seletividade	35
4.2.3.2.	Linearidade	36
4.2.3.3.	Limites de detecção e quantificação	36
4.2.3.4.	Precisão.....	36
4.2.3.5.	Exatidão.....	36
4.2.3.6.	Robustez	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Desenvolvimento da formulação.....	38

5.2.	Método analítico desenvolvido para quantificação de ácido ascórbico e de nicotinan emulsão	48
5.3.	Desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos	55
5.3.1.	Validação do método de quantificação do ácido ascórbico e da nicotinamida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	56
5.3.1.1.	Especificidade e Seletividade	56
5.3.1.2.	Linearidade.....	59
5.3.1.3.	Limite de detecção e de quantificação	62
5.3.1.4.	Precisão	62
5.3.1.5.	Exatidão.....	64
5.3.1.6.	Robustez.....	65
6	CONCLUSÃO.....	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio originado pela produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Quando a produção de radicais livres é maior que a capacidade de defesa este fenômeno ocorre, resultando em maior quantidade de oxidantes, o que acelera o processo de envelhecimento, dentre outras consequências. Para auxiliar na defesa endógena, a indústria propôs a adição de produtos naturais em cosméticos que pudessem diminuir a quantidade de oxidantes, como é o caso da nicotinamida (NIC) e do ácido ascórbico (AA). A NIC é uma das formas da vitamina B3, precursora de NADPH e NADH que apresenta potente poder redutor, resultando em capacidade antioxidante. O AA previne a oxidação descontrolada em meio aquoso, além de prevenir escorbuto, agir como anti-inflamatório, estimular a produção de colágeno da pele, amenizar os danos causados pela exposição à radiação ultravioleta e agir como agente despigmentante.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico utilizando HPLC para quantificar AA e NIC com eficiência e baixo custo. Neste contexto, a melhor separação foi obtida a partir de fase móvel contendo 0,01% de ácido trifluoracético em água ultrapura e deionizada, coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 μ m, Waters), injeção de 20 μ L, fluxo de 1,7 mL/min, absorvância de 254nm, corrida de 5 minutos. Para o ensaio de linearidade, fez-se uma curva analítica com as concentrações de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 μ g/mL ($r^2 = 0,9991$ para o AA e $r^2 = 0,9999$ para NIC). Além disso, foram obtidas respostas positivas para especificidade, precisão, exatidão e robustez, parâmetros necessários para a validação de um método analítico, o que torna o método aplicável para a quantificação de AA e NIC em emulsão.

Palavras-chave: Ácido ascórbico, nicotinamida, validação, cromatografia líquida de alta eficiência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da NIC.....	11
Figura 2 – Estrutura química do AA.....	12
Figura 3 – Camadas da epiderme e a derme com as papilas dérmicas penetrando a epiderme.....	15
Figura 4 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.....	17
Figura 5 – Oxidação do AA em ácido dehidroascórbico.....	19
Figura 6 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (70:30) v/v.....	50
Figura 7 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v.....	50
Figura 8 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v.....	51
Figura 9 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v.....	51
Figura 10 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (30:70) v/v.....	52
Figura 11 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (85:15) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v.....	53
Figura 12 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (95:5) v/v no início da injeção e terminando apenas com metanol.....	53
Figura 13 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída por água acidificada com 2,5% de ácido acético e acetonitrila (95:5) v/v.....	54
Figura 14 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (90:10) v/v no início da injeção e terminando com água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (40:60) v/v.....	54
Figura 15 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água acidificada com ácido acético a pH 2,6 e metanol (85:15) v/v.....	55
Figura 16 – Cromatograma obtido com outra coluna.....	56

Figura 17 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel contendo 0,01% de ácido trifluoracético em água.....	56
Figura 18 - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 50 µg/mL diluídas em água, vazão 1,7 mL/min, detecção a 254 nm, utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters).....	57
Figura 19 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em HCl 0,1 M, a 80°C.....	58
Figura 20 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em NaOH 0,1 M, a 80°C.....	58
Figura 21 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em H ₂ O ₂ 0,1 M, a 80°C.....	59
Figura 22 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em água, a 80°C.....	59
Figura 23 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em luz UV, a 25°C.....	59
Figura 24 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em água, a 30°.....	60
Figura 25 – Curva analítica de AA obtida por CLAE.....	61
Figura 26 – Curva analítica de NIC obtida por CLAE.....	62
Figura 27 - Sobreposição de sete cromatogramas da injeção de padrão nas concentrações de 20 a 80 µg/mL diluídas em água, vazão 1,7 mL/min, detecção a 254 nm, utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação dos testes.....	20
Tabela II. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	21
Tabela III. Composição percentual da emulsão proposta álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol), álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).....	27
Tabela IV. Métodos para determinação de AA e NIC por HPLC.....	29
Tabela V. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP.....	39
Tabela VI. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP, monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) e Pullulan.....	41
Tabela VII. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP e monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate).....	43
Tabela VIII. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP 5% e monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) 2%.....	44
Tabela IX. Gel com Pullulan para teste de viscosidade.....	45
Tabela X. Creme com Emulfeel SGP para teste de viscosidade.....	45
Tabela XI. Composição percentual da emulsão proposta contendo álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol), álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).....	47
Tabela XII. Composição percentual da emulsão proposta álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol), álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).....	48
Tabela XIII. Valores das áreas referentes ao pico de AA para a obtenção da curva analítica do método cromatográfico.....	60
Tabela XIV. Valores das áreas referentes ao pico de NIC para a obtenção da curva analítica do método cromatográfico.....	61
Tabela XV. Precisão do método com diferentes analistas para o AA.....	63
Tabela XVI. Precisão do método com diferentes analistas para a NIC.....	63
Tabela XVII. Teste F da precisão intermediária para o AA.....	64
Tabela XVIII. Teste F da precisão intermediária para a NIC.....	64

Tabela XIX. Exatidão do método para análise de emulsão contendo AA.....	65
Tabela XX. Exatidão do método para análise de emulsão contendo NIC.....	65
Tabela XXI. Valores obtidos na avaliação da robustez do Protocolo de HPLC para análise de AA e NIC.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido ascórbico
Abs	absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	água em óleo
BHT	butil hidroxitolueno
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DPR	desvio padrão relativo
EDTA Na ₂	ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
Lab	laboratório
LDD	limite de detecção
LDQ	limite de quantificação
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
NIC	nicotinamida
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
O/A	óleo em água
r ²	coeficiente de correlação linear
RL	radical livre
UV/vis	ultravioleta/visível
TFA	ácido trifluoroacético
µg	micrograma
µL	microlitro
UV	ultravioleta

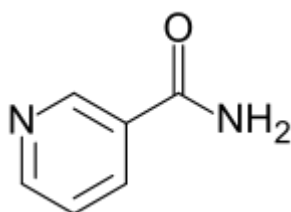
1 INTRODUÇÃO

O equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) é vital para o funcionamento normal do organismo. O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre os compostos anteriores, com maior quantidade de oxidantes (FINKEL & HOLBROOK, 2000; SCHAFER & BUETTNER, 2001) que está relacionado com danos lipídicos, proteicos e genéticos e tem como consequência uma variedade de doenças humanas, além do processo de envelhecimento (VALKO et al., 2007).

Mecanismos de defesa endógenos foram desenvolvidos para a eliminação destes oxidantes. Alguns produtos naturais com propriedade antioxidante podem auxiliar nesta defesa endógena, como é o caso de cosméticos com agentes antioxidantes como a nicotinamida e o ácido ascórbico.

A NIC (Figura 1) é uma das formas da vitamina B3 que pode ser adicionada em cosméticos de uso tópico por ser precursora de NADPH e NADH, sendo que este apresenta um potente poder de redução, resultando em uma enorme capacidade antioxidante. Há uma diminuição da produção de NADH pelo organismo com o passar dos anos, o que torna benéfica a reposição desta substância para que os danos causados pelos radicais livres sejam minimizados.

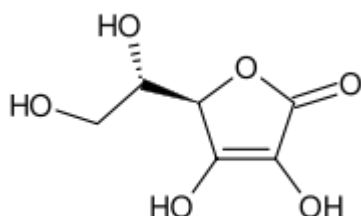
Figura 1 - Estrutura química da NIC.



O AA (Figura 2), devido ao seu excelente poder redutor, protege a célula contra a oxidação descontrolada no meio aquoso (KLIMCKAC et al., 2007). Além de prevenir o

escorbuto, apresentar poder anti-inflamatório e ser essencial na integridade das paredes dos vasos sanguíneos. Outra função do AA é estimular a produção de colágeno da pele, o que reduz a flacidez, tendo como consequência a prevenção do envelhecimento precoce e também atua nos melanócitos, o que uniformiza a coloração da pele. Outro uso do AA é que este pode ser usado para amenizar os danos causados pela exposição à radiação ultravioleta. A vitamina C também pode auxiliar no tratamento de melasma por se tratar de um inibidor de melanina, o que resulta em um agente despigmentante.

Figura 2 - Estrutura química do AA.



A partir do conceito de química verde, definido como invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC), os solventes foram escolhidos de modo a seguir este padrão.

Para o controle de qualidade no âmbito da indústria farmacêutica e cosmética é essencial o desenvolvimento de metodologias que quantifiquem fármacos em matérias-primas e produtos acabados, como em uma emulsão contendo ácido ascórbico e nicotinamida. Procedimentos de validação são requeridos no desenvolvimento de métodos analíticos para que a aplicação das técnicas de quantificação e os resultados apresentem fidedignidade.

Com o uso da cromatografia de alta eficiência, foi possível a validação da metodologia a partir dos parâmetros especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A pele

O corpo é recoberto por pele, constituída de epiderme, porção epitelial de origem ectodérmica, e de derme, porção conjuntiva de origem mesodérmica. Logo abaixo da derme e em contato com a mesma, encontra-se a hipoderme, que realiza a conexão entre a derme e os órgãos subjacentes, não fazendo parte da pele, caracterizada por ser um tecido conjuntivo frouxo e com muitas células adiposas (Figura 3).

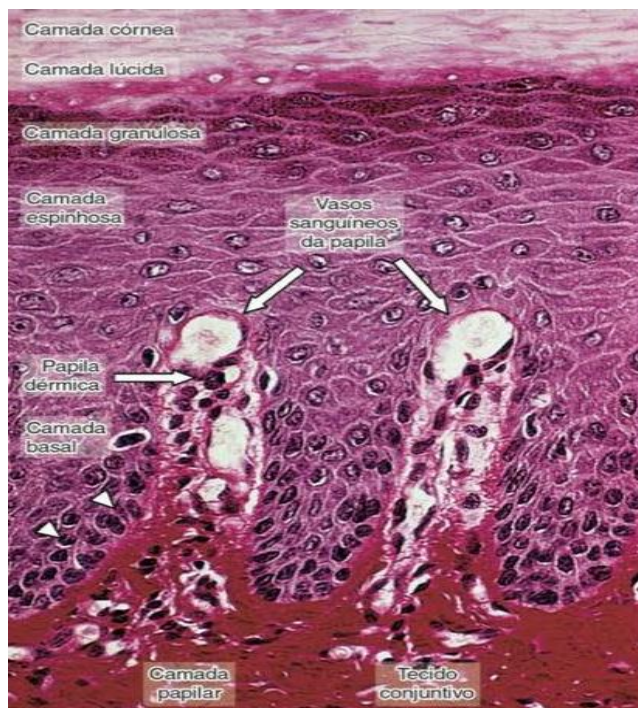
Cerca de 16% do peso corporal é correspondente à pele, um dos maiores órgãos do corpo humano com importante papel. A epiderme apresenta uma camada queratinizada, responsável por proteger o organismo contra atritos e desidratação. Possui terminações nervosas sensoriais que recebem informações constantes sobre o ambiente e as envia para o sistema nervoso central. Além de participar da termorregulação corpórea, a pele produz vitamina D₃ através da radiação ultravioleta do sol sobre os precursores sintetizadores do organismo.

A estrutura e espessura da epiderme variam de acordo com o local estudado. Em regiões de maior espessura, pode chegar até a 1,5mm e apresenta cinco camadas, da derme para a superfície – basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal apresenta alta taxa mitótica, sendo responsável, junto com a cama espinhosa, pela constante renovação da pele. Os desmossomos e os filamentos de queratina, presentes na camada espinhosa, mantêm a coesão entre as células da epiderme e promovem resistência ao atrito. Já as células da camada granulosa apresentam grânulos lamelares que se fundem com a membrana plasmática e causam a expulsão do seu conteúdo para o espaço intercelular, onde há depósito de material lipídico, o que contribui para a formação de uma barreira contra a penetração de substâncias e torna a pele impermeável à água. A camada lúcida e a camada córnea apresentam filamentos de queratina, formada por seis polipeptídios diferentes.

A derme apresenta apenas duas camadas, a papilar, superficial, e a reticular, mais profunda. A camada papilar contém fibrilas especiais de colágeno que contribuem na adesão da derme à epiderme, além de apresentar pequenos vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme. Enquanto que a camada reticular, mais espessa, possui muitas fibras do sistema elástico, responsável pela elasticidade da pele, além de serem encontradas, nesta camada, estruturas derivadas da derme, sendo folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas.

Por fim, há a hipoderme, camada com quantidades variadas de tecido adiposo, que podem vir a constituir o panículo adiposo, responsável por modular o corpo, além de ser uma reserva energética e atuar como isolante térmico, protegendo contra a perda de calor corpóreo.

Figura 3 - Camadas da epiderme e a derme com as papilas dérmicas penetrando a epiderme.



O envelhecimento da pele é resultado de fatores genéticos, os fatores intrínsecos, o que levam ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio a nível intracelular. Além disto, há também os fatores extrínsecos, que contribuem para o envelhecimento precoce da

pele, como é o caso da exposição à radiação solar ultravioleta, à fumaça do cigarro e o uso excessivo de álcool, dentre outros fatores.

2.2 Estresse oxidativo e o envelhecimento precoce

Mecanismos de defesa antioxidante se desenvolveram a partir da constante produção de radicais livres (RL) durante os processos metabólicos e têm como função controlar os níveis intracelulares destas substâncias reativas e a ocorrência de danos decorrentes. Os RL possuem efeitos benéficos no funcionamento do organismo, relacionados com a transferência de elétrons nas reações bioquímicas, como geração de ATP, fertilização do óvulo, ativação de genes e defesa no processo de infecção, quando em proporções adequadas. Além disso, o peróxido de hidrogênio é uma molécula-chave em alguns sinais de transdução e na ativação de fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), e o ânion $O_2^{\cdot -}$ funciona como “antibiótico celular”, combatendo micróbios invasores. Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de RL e o sistema de defesa antioxidante, origina-se o chamado estresse oxidativo.

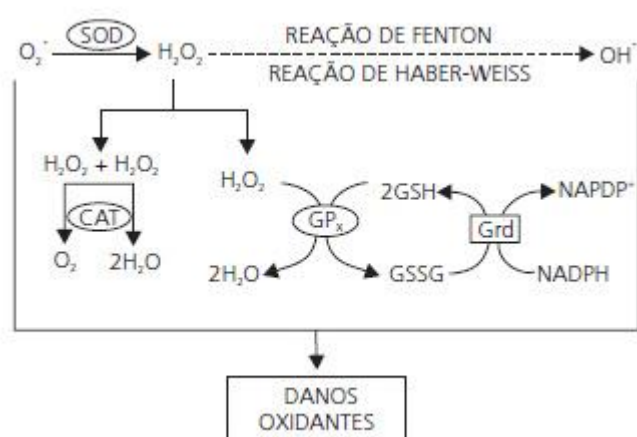
O estresse oxidativo é um processo que se instala em consequência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, quando a produção de RL é excessiva ou quando a remoção dos mesmos é insuficiente. Como consequência, temos o envelhecimento precoce, aterosclerose, diabetes, transtornos neurodegenerativos e câncer.

Os RL são gerados, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de RL, através da cadeia transportadora de elétrons. Cerca de 85% a 90% do oxigênio consumido na mitocôndria é metabolizado por meio da cadeia transportadora de elétrons, em condições fisiológicas, sendo os outros 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases, além de reações químicas de oxidação direta. A formação dos RL é controlada pela enzima citocromo oxidase, o que impede a geração excessiva na mitocôndria. Porém, cerca de 2% a 5% do

oxigênio metabolizado nas mitocôndrias sofre um desvio para outra via metabólica, o que origina os RL.

Para inibir e/ou reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, existe o sistema de defesa antioxidante, sendo este dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema de defesa enzimático é composto por uma série de enzimas que neutralizam a formação de RL, através da formação de composto menos reativos, como é o caso das enzimas CAT e GPx que agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, o que é de extrema importância visto que, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, com participação dos metais ferro e cobre, essa espécie reativa é capaz de gerar o radical $\text{OH}^\bullet$, o qual não apresenta sistema enzimático de defesa (Figura 4).

Figura 4 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.



Além disso, há também o sistema de defesa não-enzimático que corresponde aos antioxidantes exógenos, provenientes da dieta, entre os quais se destacam o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, com potente atividade antioxidante. Os minerais também apresentam essa capacidade, como é o caso do zinco, cobre, selênio e magnésio.

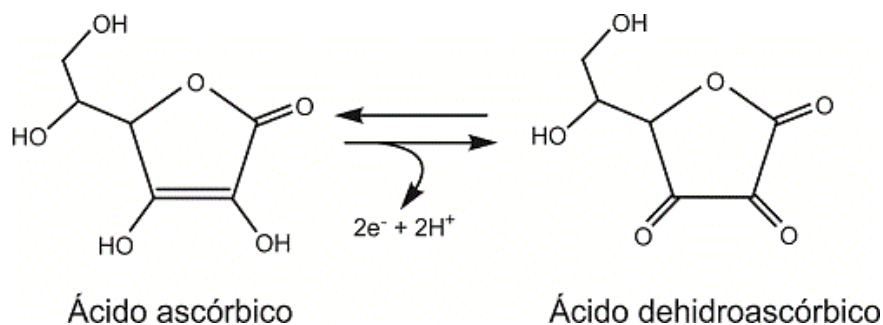
2.3 Ácido ascórbico

Os citros, assim como diversas frutas, apresentam a característica de serem ricos em compostos antioxidantes que ajudam na diminuição da incidência de doenças degenerativas e retardam o envelhecimento precoce. A vitamina C, ou AA, é o antioxidante mais presente em citros, juntamente com os polifenóis, principalmente flavonoides. O AA protege a célula contra a oxidação descontrolada em meio aquoso, devido ao seu alto poder redutor, porém, o mesmo pode ser incapaz de causar a inibição dos RL em reações de peroxidação lipídica em meios lipofílicos, e os polifenóis neutralizam as moléculas de radicais livres. As vitaminas C e E possuem um sinergismo na inibição da peroxidação lipídica e também na proteção do DNA contra danos oxidativos.

O AA é um nutriente hidrossolúvel e termolábil muito importante da dieta humano, devido ao fato de essa substância não ser sintetizada pelo organismo, pois há ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, responsável por catalisar a etapa final de síntese do AA. Frente a incapacidade de síntese endógena deste nutriente, o corpo humano adquire-o por meio da dieta ou de suplementação vitamínica.

O AA é encontrado sob duas formas, a reduzida (ácido L-ascórbico) e a oxidada (ácido dehidroascórbico), sendo a forma reduzida a mais encontrada em produtos naturais. No organismo, ocorre a transformação de AA em ácido dehidroascórbico quando há perda de dois elétrons e esta é reversível, permitindo a transformação de uma das substâncias na outra (Figura 5). Isto se deve a um sistema oxidorreduzidor capaz de transportar hidrogênio, a nível celular, na respiração. O AA e sua forma oxidada possuem atividade vitamínica idêntica devido ao fato de o ácido dehidroascórbico ser facilmente reduzido e novamente retido como AA nos tecidos intracelulares.

Figura 5 – Oxidação do AA em ácido dehidroascórbico



O responsável pelos efeitos benéficos, em humanos, do AA é a cofunção em processos enzimáticos e a capacidade antioxidante devido à captura de ânions superóxido ($\text{OH}^\bullet$) para formar o radical semideidroascorbato, reduzido pela glutathiona reduzida (GSH). Verificou-se que as concentrações de vitamina C no sangue tem relação positiva com a saúde e inversa à morbidade e mortalidade porque o AA está associado com os níveis de colesterol c-HDL e hemoglobina. Portanto, o AA também pode ser utilizado como um biomarcador para o estado de saúde e para o status nutricional do paciente. Porém, concentrações baixas ou elevadas de AA no organismo podem atuar como oxidantes, o que possibilita dizer que esta substância também pode ser utilizada como um biomarcador do estresse oxidativo em humanos, através da quantificação dos níveis circulantes do mesmo.

O AA é importante para o funcionamento celular, o que é evidente no tecido conjuntivo, durante a formação de colágeno, sendo co-fator de duas enzimas que atuam na biossíntese do colágeno, a lisil e a prolil hidroxilases, responsáveis por catalisar a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos de colágeno, que levará a formação de colágeno, após uma série de etapas. Estas enzimas são enzimas férricas, portanto, o AA previne a oxidação do ferro, protegendo-as contra a auto-inativação. Além disso, demonstrou-se que o AA regula a síntese de colágeno tipo I e III pelos fibroblastos dérmicos humanos, que apesar de a capacidade proliferativa e a síntese de colágeno serem dependentes da idade, o AA estimula estes dois eventos, independente da idade do paciente. A alteração da matriz extracelular dérmica, consequência do envelhecimento, influenciará na perda das

propriedades mecânicas cutâneas e no desenvolvimento de rugas. Portanto, o AA pode ser utilizado para auxiliar contra o processo de envelhecimento.

Segundo Huang *et al.*, o AA apresenta capacidade de aumentar o poder antioxidante do soro (*serum oxygenradical absorbance capacity - ORAC*), diferentemente da vitamina E, o que evidencia que o AA desempenha melhor atividade antioxidante em meios hidrofílicos.

A vitamina C tem ação protetora nos grupos tiol (-SH) das proteínas albumina e ALA-D (*δ-aminolevulinate dehydratase activity*), o que resulta em uma correlação entre os níveis plasmáticos da vitamina e destas proteínas, visto que estas são vulneráveis à oxidação.

Outra característica do AA é a instabilidade. Em pH fisiológico, esse se encontra na forma de ascorbato, sendo rapidamente oxidado a d-hidroascorbato e, posteriormente, depletado no fluido extracelular. Alguns fatores influenciam a oxidação do AA, como temperatura, luz, pH, solventes, saturação de oxigênio e presença de enzimas oxidantes ou de íons ferro.

Vários métodos são descritos para a quantificação de AA sanguíneo. Métodos espectrofotométricos se baseiam na derivatização da vitamina ou no seu poder redutor, tendo como vantagens o baixo custo e rapidez na análise. Porém, por se tratar de amostras biológicas, outras substâncias presentes podem interferir na quantificação. Portanto, o método padronizado para quantificação de AA é a CLAE, por se tratar de uma técnica mais sensível e específica, sem necessidade de derivatização.

2.4 Nicotinamida

A nicotinamida, uma das formas da vitamina B3, juntamente com o ácido nicotínico, é uma substância ativa, derivada da niacina. A niacina é encontrada em alimentos de origem vegetal e animal, tem sua absorção no estômago e intestino delgado e sua eliminação ocorre pela urina. O organismo pode produzi-la a partir do triptofano, sendo que 60mg este

aminoácido produzirá 1mg de vitamina B3, portanto, a niacina não pode ser considerada uma vitamina.

A NIC é uma substância hidrossolúvel e que faz parte da coenzima nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD). O NAD^+ e o NADP^+ são coenzimas nas reações de oxirredução em que sofrem redução do anel piridina, através da incorporação de um íon hidreto. Estas coenzimas apresentam suas formas reduzidas, o NADH e NADPH, respectivamente. É essencial para o metabolismo de carboidratos e para reações de transferência de adenosina difosfato-ribose não redox envolvidas no reparo de DNA.

Quando em uso tópico, a NIC apresenta propriedade de reduzir a perda de água através da pele, além de melhorar a hidratação da camada córnea, aumentar a síntese de queratina e estimular a síntese de ceramidas. No mais, atua na redução de rugas, palidez, manchas hiperpigmentares e pele amarelada.

Estudos realizados com a vitamina A e B3 demonstraram uma potente ação antioxidante e anti-inflamatória, consequentemente, produtos com estas substâncias se mostraram efetivos no tratamento do envelhecimento cutâneo e no tratamento de algumas inflamações da pele, como acne e alterações de pigmentação.

2.5 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos conta com testes classificados em quatro categorias, sendo que cada categoria exige um conjunto de testes. Na Tabela I encontra-se a classificação dos testes e, na Tabela II, os ensaios necessários para a validação de um método analítico, segundo preconizado pela RE 899 de 29/05/2003.

Tabela I. Classificação dos testes.

Categoria	Finalidade do teste
-----------	---------------------

I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

Tabela II. Ensaaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não

Limite de	Não	Sim	Não	*	Não
Quantificação					
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Portanto, os parâmetros analisados para os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho foram especificidade/seletividade, linearidade, limite de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

2.5.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade de detecção de um composto de interesse em presença de outros componentes da matriz, como impurezas e produtos de degradação.

Para análise de impurezas e medidas do teor de determinada substância, a especificidade resulta da comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades dentro de um limite de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que esses materiais não influenciam no resultado do teste.

2.5.2. Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que há uma proporção direta entre os resultados obtidos e a concentração do analito, enquadrando-se em um intervalo específico.

A linearidade deve ser determinada através da análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. O gráfico poderá apresentar relação linear e, caso isso ocorra, os resultados dos testes deverão passar por métodos estatísticos para determinar-se o coeficiente de correlação, coeficiente angular, dentre outros. O coeficiente de correlação (r) deve ser igual à, no mínimo, 0,99.

2.5.3. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção caracteriza a menor concentração detectável do analito, mas não necessariamente quantificável, sob condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção (LDD) pode ser expresso pela equação abaixo:

$$LDD = \frac{3 \times s}{S}$$

Na qual: s = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do aparelho).

Já o limite de quantificação é caracterizado como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. O limite de quantificação (LDQ) é definido pela equação abaixo:

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

Na qual: s = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

2.5.4. Precisão

Avalia a proximidade entre vários resultados obtidos através de uma mesma amostra. Expressa como desvio-padrão ou coeficiente de variação, é dada pela seguinte equação:

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100$$

Na qual: s = desvio-padrão das recuperações e M = média das recuperações.

Não se deve admitir valores maiores de 5%.

2.5.5. Exatidão

A exatidão é definida como a similaridade entre o valor real do analito na amostra e o valor real. Pode ser determinada através do teste de recuperação da concentração média do analito em diferentes concentrações e pelo desvio padrão relativo. No teste de recuperação, uma quantidade conhecida de uma substância química de referência é adicionada à amostra e então, faz-se o cálculo do percentual recuperado pelo método, por meio de comparação com resultados obtidos por métodos já caracterizados.

2.5.6. Robustez

É a medida da capacidade do método em permanecer inalterado sob pequenas variações, indicando sua confiabilidade durante o uso e possibilitando que precauções sejam incluídas no procedimento.

3 OBJETIVOS

- Desenvolver e validar um método analítico que quantifique AA e NIC com eficiência e baixo custo;
- Aplicar a metodologia validada em uma emulsão contendo os dois ativos citados anteriormente.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais

Água destilada, água ultrapura obtida por sistema Milli-Q® (Malsheim, França), acetonitrila (Synth), etanol (Synth), metanol (J.T. Baker®), grau CLAE; ácido trifluoracético (Sigma-aldrich, Brasil), ácido ascórbico (Synth), nicotinamida (Fragon), Cetearyl Alcohol, Glyceril Stearate, Ceteareth-20, Shea Butter, Theobroma grandiflorum Seed Butter, Coffea arabica Seed Oil, C13-15 Alkane, Octyl Stearate, Dibutyl Adipate, Caprylic/capric Glycerides, BHT, Sodium Cetearyl Sulfate, Glycerin, Phenoyethanol, EDTA Na₂, Pullulan®, hidróxido de sódio, solução de ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio. Foi utilizada membrana com poro de 0,45 µm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nagel®, Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de AA + NIC e papel de filtro para filtrar a amostra.

4.1.2 Equipamentos

Pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), ultra-som (Unique Ultrasonic Clear), estufa (Quimis), peagômetro digital (Gehaka PG 1800), balança analítica (Bel Enginneering). O sistema cromatográfico utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters®, constituído por bomba cromatográfica gradiente binária Waters®, injetor manual Rheodyne Breeze® 7725i e detector de absorvância UV-VIS Waters® 2487, contendo *software* Empower®. Foi utilizada coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters). As soluções constituintes da fase móvel foram desgaseificadas em ultrassom (Unique®, Indaiatuba, Brasil).

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e preparo da formulação

Para que a metodologia analítica a ser desenvolvida pudesse ser aplicada, foi necessário o desenvolvimento de uma emulsão contendo AA e NIC.

Diversas fórmulas foram desenvolvidas e incorporadas nos ativos propostos, porém todas apresentaram mudanças estruturais que refletiram na estabilidade da preparação. Tais fórmulas e o histórico do desenvolvimento encontram-se apresentados no item Resultados e Discussões.

A emulsão desenvolvida e aplicada no desenvolvimento e validação da metodologia proposta está representada na tabela III.

Tabela III. Composição percentual da emulsão proposta contendo álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol), álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).

INCI name	%
Cetearyl Alcohol	8,00
Glyceril Stearate	1,80
Ceteareth-20	1,30
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Sodium Cetearyl Sulfate	1,30

Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Pullulan	3,00
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

Após o desenvolvimento da emulsão com aspectos e viscosidade adequados, os constituintes da mesma, apresentados na tabela III foram devidamente pesados em balança semi-analítica, em recipientes adequados. A emulsão foi obtida através do método de mistura direta da fase aquosa previamente aquecida a 70-80°C vertida sob a fase oleosa a 60-70°C, com agitação manual até homogeneização total.

Os ativos foram adicionados à emulsão pouco antes do uso para que qualquer possível degradação fosse minimizada, obtendo a amostra. Em 2 g de emulsão foram adicionados 0,02 g de cada ativo, em um balão volumétrico, e o volume foi completado para 100 mL com água para que a solução tivesse concentração de 200 µg/mL de AA e NIC. A mesma foi duplamente filtrada, primeiro em papel de filtro e depois em membrana de celulose regenerada (0.45 µm) e, após este procedimento, uma alíquota de 2,5 mL foi diluída em um balão volumétrico de 10 mL para análise no HPLC, para que nenhuma partícula tivesse tamanho que inviabilizasse o teste.

4.2.2 Desenvolvimento do método analítico para quantificação de AA e NIC em emulsão

Anteriormente ao desenvolvimento de um método analítico quantitativo, pesquisas bibliográficas foram realizadas para que métodos já existentes fossem usados como base. A tabela IV é um compilado desta pesquisa.

Tabela IV. Métodos para determinação de AA e NIC por HPLC

	Fase móvel	pH	Vazão	Tempo de retenção	Comprimento de onda	Coluna
Ácido ascórbico	25mM de NaH_2PO_4 e 0,00125% de NaN_3	2,5 ajustado com ácido orto- fosfórico	1mL/min		245nm	Coluna de fase reversa C18 (250x4,6x5μ m)
	Tampão de acetato de sódio 0,004mol/L, EDTA 0,05mol/L e fosfato de tributilamônio 0,5mol/L	6,7	0,6mL/mi n	15min	254nm	Coluna de fase reversa C18 (250x4,6x5μ m)
	Água ultrapura com 0,1% de ácido acético		0,8mL/mi n	10min	254nm	Coluna de fase reversa Shim pak CLC ODS (3,9mmx50m mx4μm)

Ácido orto-fosfórico a			15min	210nm	Coluna
0,1%					Supelcogel C-610H com 30 cm × 7,8 mm ID de dimensão
Tampão fosfato	2,5	1mL/min	10min	254nm	Coluna Agilent C18 (2,5x25mmx5 µm)
Metanol:THF:H2O 26:17:57, acidificada com 0,3% de ácido fórmico		0,2mL/min	30min	370nm	Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm)
0,01% de solução de ácido sulfúrico	2,6	1mL/min		245nm	Coluna de fase reversa C18 Spherisorb [®] ODS2 (5 µm) (4.6 mm × 250 mm)
1,6g of decilamina, 80ml de acetonitrila, 100ml de solução de acetate de		1mL/min	12,8min	265nm	Coluna LiChrospher RP-18; 5 µm;

	sódio (0.25 M); pH 5.4 e					4.6 × 250 mm
	820ml de água destilada;					
	o pH foi ajustado para					
	5,4 com ácido fosfórico					
	85% e 50mg TCEP; HCl					
	foi adicionado na					
	solução final					
	50% acetonitrila e 50%	4,75	1,2mL/min	5,3min	205nm	Coluna
	solução tampão de		n			Waters
	fosfato de sódio					Spherisorb
	(10 mM)					S ₅ NH ₂ (250
						× 4.6 mm,
						5 µ; Waters)
	95% de NaH ₂ PO ₄ em	pH foi 0,7		4,18min	242nm	Coluna RP-18
	água (0,05 M) e 5% de	ajustado	mL/min			Lichrosorb
	metanol	para 3.6				(15 cm x 4.6
		adiciona				mm, 5 µm d.
		ndo 85%				p.) da Merck
		de ácido				(Darmstadt,
		fosfórico				Germany).
	2% (v/v) de solução de	2,5	1ml/min	3,1min	243nm	
	ácido acético em água					
Nicotinamida	1,88g	de 3,5	sistema		270nm	Coluna de
	hexanossulfonato	de ajustado	isocrático:			fase reversa
	sódio em 1L de água	com	de 0,01 a			C-8

adicionada de 5mL de ácido	10 min:		(150x4,6x5μ
ácido acético glacial e fosfórico	1,2		m)
1mL de trietilamina	10M	mL/min;	
	aos 12		
	min: 1,8		
	mL/min e		
	dos 12 aos		
	40 min:		
	1,8		
	mL/min		
70% sal de sódio de 2,5		254nm	Coluna de
ácido hexanosulfônico e			fase reversa
30% metanol			C18
			(250x4,6x5μ
			m)
Mistura de tampão	1,0mL/min	25min	254nm
(contendo o pareador	n		Coluna Nova-
iônico hexanosulfonato			Pack C18
de sódio) e metanol na			(250 x 4,6
proporção 70 para 30			mm, 5 μm)
Água ultrapura	0,8mL/min		Coluna de
	n		troca
			catiônica de
			Pb(II)–
			Aminex HPX-

					87P (300 mm × 7,8 mmx9,0 µm)
Mistura de acetonitrila, 5,0 0,02 fosfato de potássio e 0,01M ortofosfato de dipotássio numa razão de 80:20 (v/v)	1mL/min	2,7min			Coluna C18 Kromasil
70% tampão (sal de sódio de ácido sulfônico) e 30% metanol (HPLC grade).	1ml/min	5,6min	233nm		Coluna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) column (Waters)
Fase móvel de método gradient constituída de água deionizada (A) e metanol (B): 0–5 min, 5% B (v/v); 5–15 min, 35% B (v/v); 15–25 min, 5% B (v/v); and 25– 30 min, 5% B (v/v).	1mL/min		260nm		Coluna C18 HPS™ (150 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, USA)
Metanol 0.020 M, 5,5 tampão de fosfato de	1mL/min	3,87min	254nm		Coluna 5 µm, 250 mm × 4.6

potássio (40:60, v/v).		mm	i.d.
		Hypersil	
		Fluophase	
		PFP	
		(Cheshire,	
		England)	
Acetonitrila : methanol :	0,2mL/min	3,78min	Coluna Grom
água : ácido fórmico	n		Hypersil CPS
(700/190/110/1, v/v/v/v).			5 µm
			(250 × 2 mm)
Método gradiente: %B	1mL/min	4,3min	220nm
0.00 min 10%, 4.00 min			Coluna C18
10% 9.00 min 90%.			Agilent
Solventes A: H2O			Zorbax
(Millipore) B: Metanol			Eclipse Plus

A partir destas informações, diversas condições cromatográficas foram testadas no ensaio cromatográfico por HPLC para que fosse selecionada a melhor condição que quantificasse os ativos, com redução da assimetria do pico, minimização dos danos à coluna cromatográfica e de geração de resíduos tóxicos. O equipamento utilizado foi o Waters*, constituído de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248, além de coluna RP₁₈ (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters). A solução padrão utilizada em todas as injeções era composta de AA + NIC a 200 µg/mL em água. Variações entre as injeções foram feitas, como mudança de

método isocrático para método gradiente, acidificação do meio com ácido acético e mudança da coluna. Deste modo, a condição cromatográfica utilizada para a quantificação de AA + NIC em emulsão é constituída de fase móvel contendo 0,01% de ácido trifluoracético em água, coluna RP₁₈ (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), injeção de 20 µL, vazão de 1,7 mL/min, absorvância de 254nm, corrida de 5 minutos.

4.2.3. Validação do método analítico

De acordo com a ICH, *Internacional Conference on Harmonization*, o objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que este é adequado para o seu propósito, seguindo os parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, precisão, robustez e limites de detecção e quantificação.

4.2.3.1. Especificidade e Seletividade

A especificidade foi estudada a partir de três alíquotas do padrão de AA + NIC na concentração de 50 µg/mL, três alíquotas da amostra da emulsão base e três alíquotas da emulsão à 1% de ativo. Após este processo, as alíquotas foram injetadas no cromatógrafo. Para a avaliação da seletividade, como as impurezas e produtos de degradação não estavam disponíveis, a mesma pode ser estudada através de indução do analito à condições de estresse, forçando a obtenção de produtos de degradação, o que permite verificar a ocorrência destes produtos na análise. A solução padrão de AA + NIC na concentração de 50 µg/mL foi submetida à solução de hidróxido de sódio 0,1 M, solução de ácido clorídrico 0,1 M, solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes e água, todas a 80°C, além de luz ultravioleta a 25°C e estufa a 35°C, por um período de oito horas. Com esta análise, foi possível verificar se há presença de picos de degradação coincidentes com os dos ativos.

4.2.3.2. Linearidade

Vinte microlitros foram manualmente injetados na coluna da solução de AA + NIC, em concentrações de 20-80 $\mu\text{L/mL}$, em triplicata. A equação da linearidade foi determinada por análise de regressão linear de mínimos quadrados.

4.2.3.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LDD) e de quantificação (LDQ) foram obtidos a partir das equações (1) e (2):

$$(1) \text{ LDD} = 3,3 \times \text{DP}/I$$

$$(2) \text{ LDQ} = 10 \times \text{DP}/I$$

Onde, DP é o desvio padrão e I é a inclinação média, obtidos pelo estudo de linearidade.

4.2.3.4. Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi analisada a partir da solução padrão de AA + NIC no mesmo dia, enquanto que a precisão intermediária foi realizada com a injeção por dois analistas e em dois dias diferentes. Um ensaio com sete repetições de injeções a 50 $\mu\text{g/mL}$ foi realizado. Os dados obtidos foram analisados e calculou-se a percentagem de DPR para as respostas analíticas.

4.2.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi estudada pela medição da recuperação do padrão de referência da concentração do método (50 $\mu\text{g/mL}$) em três níveis, de 80, 100 e 120%, em triplicata. Uma solução estoque padrão de AA + NIC a 200 $\mu\text{g/mL}$ e uma solução estoque da emulsão base a 200 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas. Em um balão volumétrico de 10 mL: 2.1, 2.5 e 2.9 mL de alíquotas da solução-padrão com adição de 2,0 mL de solução da emulsão base em

cada balão volumétrico. Respectivamente, as concentrações finais obtidas foram de 42, 50, 58 µg/mL, correspondendo a 80, 100 e 120% da concentração do método. Foram determinadas as recuperações médias em termos de percentagem de recuperação de AA e NIC do ensaio, além do desvio-padrão relativo (DPR).

4.2.3.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada através da mudança de algumas condições cromatográficas definidas, que pudessem vir a desestabilizar a análise. Solução padrão de AA + NIC a 50 µg/mL foi injetada no HPLC com as seguintes variações:

- Taxa de fluxo da fase móvel: 1.65, 1.70 e 1.75 mL/min;
- Volume de injeção: 18, 20 e 22 µL;
- Fonte da água da fase móvel: laboratório de controle de qualidade e de farmacotécnica.

Os resultados foram analisados considerando a DPR. O volume de injeção, mudança que mais apresentou variação, deve ser controlado e monitorado nas análises de rotina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da formulação

Todas as formulações foram preparadas com posterior adição dos ativos diluídos em água ultrapura deionizada, quando a mesma já apresentava viscosidade e encontrava-se a temperatura ambiente.

A tabela V representa a primeira formulação testada após a validação da metodologia analítica. Ficou estabelecido o emprego do Emulfeel SGP, um organogel auto emulsificante, composto por *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax e Sodium hydroxide. Tal material, desenvolvido e comercializado pela Chemyunion®, representa o componente fundamental para a elaboração da emulsão proposta. A emulsão obtida apresentou características de média viscosidade, com fluxo e sensorial de toque seco após a aplicação.

Após a diluição dos ativos em pequena quantidade de água, esta solução foi adicionada à emulsão previamente preparada e resultou em perda completa da viscosidade. Este fato pode ser justificado devido à adição de um ácido à formulação, o que causou uma interação desfavorável à estrutura da emulsão, considerando que o Emulfeel SGP apresenta em sua composição o espessante hidrofílico *Polyacrylic Acid* neutralizado com *Sodium hydroxide* e que tal proposta não suporta acidez, soma-se a isto a necessidade da adição de água na emulsão já preparada, por conta da necessidade de solubilizar os ativos.

Tabela V. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP

INCI name	%
Helianthus annuus (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate,	4,50

Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax, Sodium hydroxide	
PPG-2 Ceteth-20	0,50
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

A tabela VI representa uma segunda formulação testada. A emulsão apresentou boa viscosidade, bom espalhamento, sensorial inicial pegajoso, mas, pós-aplicação, sensorial de toque seco e deslizante. Se comparada com a formulação representada na tabela V, essa preparação apresentou modificações que incluíram o monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) e o Pullulan. O monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) é um co-emulsionante não iônico, ou emulsificante auxiliar, que contribui com a consistência da emulsão e é largamente empregado em emulsões do tipo O/A e A/O, podendo ser utilizado em uso interno

e também em uso externo. Quando utilizado externamente, apresenta propriedades emolientes e, se associado a um tensoativo aniônico primário em pequenas quantidades, pode produzir auto-emulsões, utilizadas em sistemas do tipo O/A. Produz emulsões brilhantes, brancas e estáveis, além de fácil manuseio. Já o Pullulan, material produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, apresenta atividade tensora e hidratante na pele, além de contribuir para a viscosidade da emulsão.

Após a adição dos ativos solubilizados em água, esta emulsão também perdeu completamente a viscosidade.

Tabela VI. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP, monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) e Pullulan.

INCI name	%
Helianthus annuus (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax, Sodium hydroxide	4,50
Glyceril Stearate	1,20
PPG-2 Ceteth-20	0,50
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25

BHT	0,05
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Pullulan	3,00
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

A tabela VII representa a composição de uma emulsão proposta que não contém o Pullulan. A retirada deste componente não alterou o resultado final da emulsão representada na tabela VI. Esta modificação foi feita para verificar se este componente afetaria a viscosidade da emulsão após a adição dos ativos solubilizados em água.

Como resultado, esta formulação perdeu a viscosidade inicial após a adição dos ativos, o que comprovou que o Pullulan não interfere na viscosidade da emulsão quando em contato com o AA e a NIC.

Tabela VII. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP e monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate).

INCI name	%
Helianthus annuus (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceril Stearate,	4,50
Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax, Sodium hydroxide	
Glyceril Stearate	1,20

PPG-2 Ceteth-20	0,50
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

A tabela VIII representa uma formulação desenvolvida a partir da formulação indicada na tabela VII, com um aumento na porcentagem de Emulfeel SGP, de 4,5% para 5,0%, e de monoestearato de glicerila, de 1,20% para 2,00%. Como o Emulfeel SGP é um material auto-emulsificante e o monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) é um agente de consistência e um material emulsificante auxiliar, propõe-se que tais alterações aumentem a viscosidade do sistema proposto a tal ponto que a inclusão dos ativos e a perda de viscosidade esperada resultem em uma preparação final com viscosidade aceitável. Porém, o observado foi uma perda de viscosidade considerável como acontecido com as demais preparações que empregou-se o Emulfeel SGP como material auto-emulsificante.

Tabela VIII. Composição percentual da emulsão proposta contendo Emulfeel SGP 5% e monoestearato de glicerila (Glyceril Stearate) 2%.

INCI name	%
Helianthus annuus (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax, Sodium hydroxide	5,00
Glyceril Stearate	2,00
PPG-2 Ceteth-20	0,50
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

A tabela IX indica a formulação de um gel espessado com Pullulan. O preparo envolveu a cuidadosa adição de Pullulan em água, a qual apresentou viscosidade satisfatória. Os ativos foram solubilizados em água e adicionados à solução descrita anteriormente e a viscosidade não foi perdida, reforçando que o Pullulan, quando em contato com AA e NIC, não interfere na viscosidade da emulsão.

Tabela IX. Gel com Pullulan para teste de viscosidade

INCI name	%
Pullulan	3,00
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

Um creme, indicado na tabela X, apenas com Emulfeel SGP, água e os ativos foi preparado para teste da viscosidade. O Emulfeel SGP foi adicionado em um béquer contendo água e, contrariando a proposta do fabricante do material, este foi aquecido, resultando em uma emulsão com boa viscosidade após resfriamento. Os ativos foram solubilizados em água e adicionados a esta emulsão já preparada e observou-se perda quase total da viscosidade, o que indica que os ativos interferem na viscosidade da emulsão produzida pelo Emulfeel SGP.

Tabela X. Creme com Emulfeel SGP para teste de viscosidade

INCI name	%
Helianthus annuus (sunflower) seed oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, Euphorbia cerifera (candelilla cera) wax, Sodium hydroxide	4,50

Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

A tabela XI mostra uma formulação proposta diferente das anteriores. O Emulfeel SGP foi retirado da formulação, assim como o PPG-2 Ceteth-20 (álcool cetílico etoxilado e propoxilado), ambos agentes emulsificantes. Nesta nova formulação, foi adicionado álcool cetoestearílico, álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE e cetil estearil sulfato de sódio.

O álcool cetoestearílico é um componente muito utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos por atuar como agente de consistência, atribuindo à formulação características como viscosidade, emoliência e estabilidade. Este excipiente é extremamente suave e compatível com a pele, além de proporcionar proteção à pele, o que justifica seu grande uso em cremes, loções cremosas, condicionadores capilar, entre outros.

Outro componente desta formulação é o álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Cetareth-20). Este é constituído por álcoois graxos etoxilados derivados da reação de álcoois cetílicos, cetoestearílico e oleílico de origem natural com óxido de etileno (EO). Quando combinado com álcoois graxos utilizados como agentes de consistência, o resultado são emulsões O/A com alta estabilidade. Neste caso, o álcool cetoestearílico (Cetearyl Alcohol) foi o escolhido para esta combinação.

Já o cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate) é um tensoativo aniônico da classe dos álcoois graxos sulfatados. Tem a característica de ser agente emulsificante em formulações de uso tópicos, resultando em emulsões O/A.

A emulsão foi preparada primeiramente sem os ativos e apresentou toque seco, boa aparência e boa viscosidade. AA + NIC foram solubilizados em água e adicionados à emulsão. Houve perda parcial da viscosidade da emulsão após esta adição, o que

possivelmente poderia ser corrigido com uma modificação na formulação, aumentando a concentração do agente de consistência.

Tabela XI. Composição percentual da emulsão proposta contendo álcool cetoestearílico (Cetearyl Alcohol), álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).

INCI name	%
Cetearyl Alcohol	5,00
Glyceril Stearate	1,80
Ceteareth-20	1,30
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Sodium Cetearyl Sulfate	1,30
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Pullulan	3,00
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00

Nicotinamide	1,00
--------------	------

A tabela XII traz uma modificação realizada a partir da composição da emulsão representada na tabela XI. Como a viscosidade foi parcialmente perdida, e não totalmente perdida como observado nas demais formulações, aumentou-se a concentração de álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol) de 5,00% para 8,00%.

A emulsão foi preparada sem a adição dos ativos, primeiramente, e não foram observadas grandes mudanças quando comparado à emulsão da tabela XI. Os ativos foram solubilizados em água e adicionados à emulsão e não houve perda da viscosidade, mantendo-se a mesma após incorporação de AA + NIC.

Portanto, a tabela XII indica a emulsão adotada para a continuidade da quantificação de AA e NIC em emulsão, com a utilização de HPLC.

Tabela XII. Composição percentual da emulsão proposta álcool cetosteárilico (Cetearyl Alcohol), álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE (Ceteareth-20) e cetil estearil sulfato de sódio (Sodium Cetearyl Sulfate).

INCI name	%
Cetearyl Alcohol	8,00
Glyceril Stearate	1,80
Ceteareth-20	1,30
Shea Butter	0,50
Theobroma grandiflorum Seed Butter	0,20
Coffea arabica Seed Oil	0,10
C13-15 Alkane	0,25
Octyl Stearate	0,60

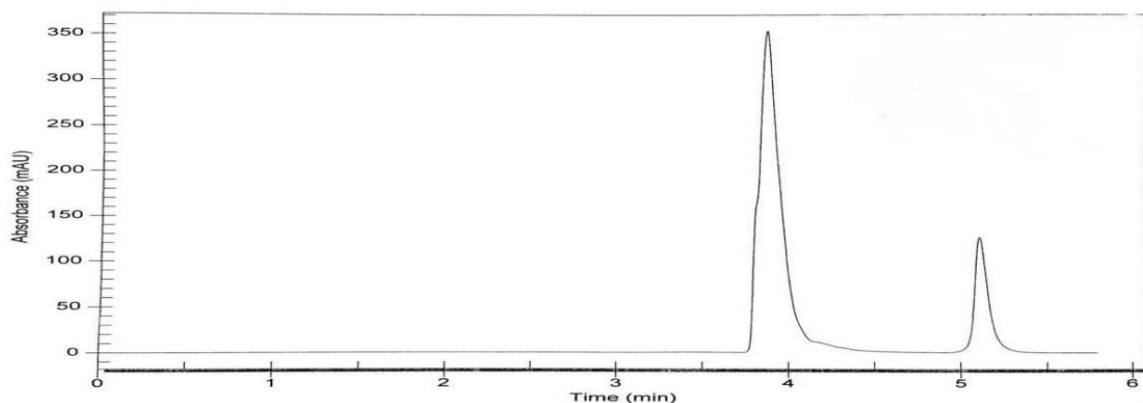
Dibutyl Adipate	0,60
Caprylic/capric Glycerides	0,25
BHT	0,05
Sodium Cetearyl Sulfate	1,30
Glycerin	3,00
Phenoyethanol	0,70
Disodium EDTA	0,10
Pullulan	3,00
Aqua	q.s.p. 100,00
Ascorbic Acid	1,00
Nicotinamide	1,00

5.2. Método analítico desenvolvido para quantificação de ácido ascórbico e de nicotinamida em emulsão

As figuras de 6 a 17 representam os cromatogramas obtidos desta etapa.

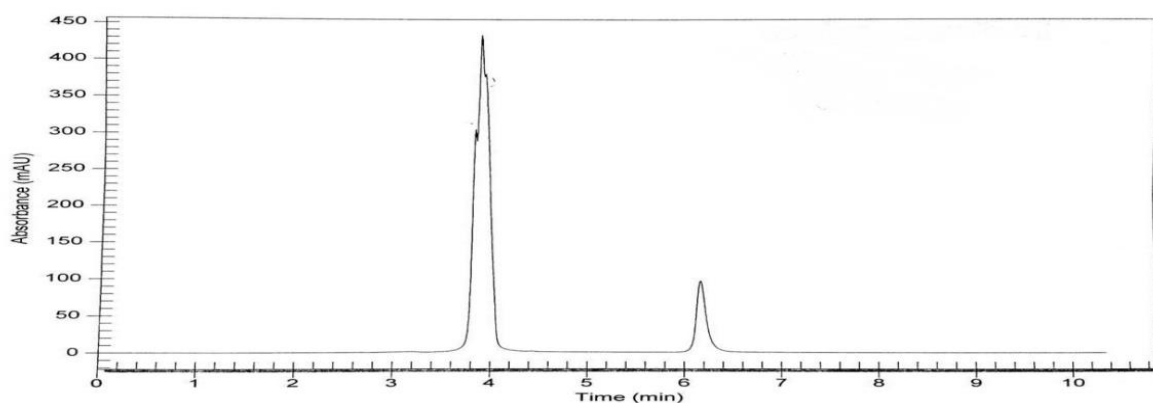
A figura 6 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel constituída de água e metanol (70:30) v/v, vazão de 0,7 mL/min, injeção de 40 µL, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 15 min. Neste cromatograma, o primeiro pico, de AA, apresentou assimetria frontal, o que pode indicar algum interferente, além de ambos os picos estarem em uma faixa muito pequena de absorbância.

Figura 6 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (70:30) v/v



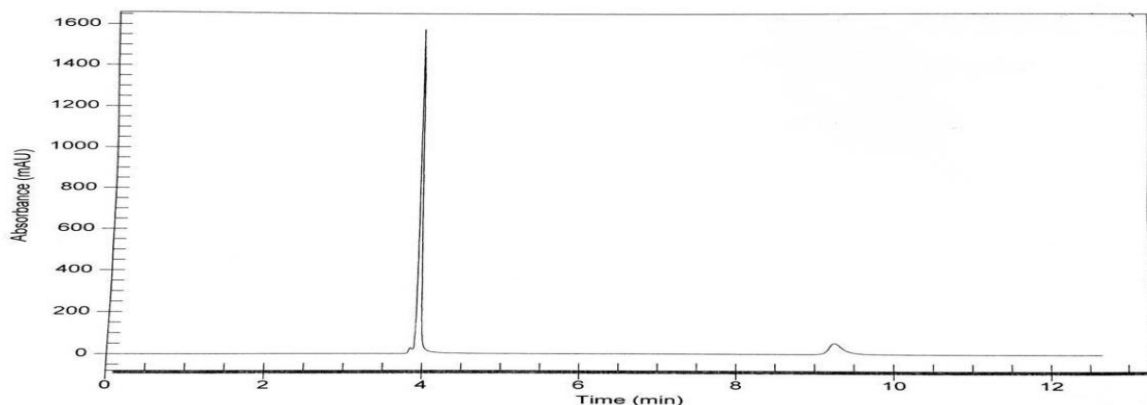
A figura 7 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v, vazão de 0,7 mL/min, injeção de 40 μ L, detecção a 262nm, com tempo de corrida de 15 min. Com estas condições cromatográficas, o pico de AA obtido não foi satisfatório devido a algumas variações no topo do pico.

Figura 7 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v



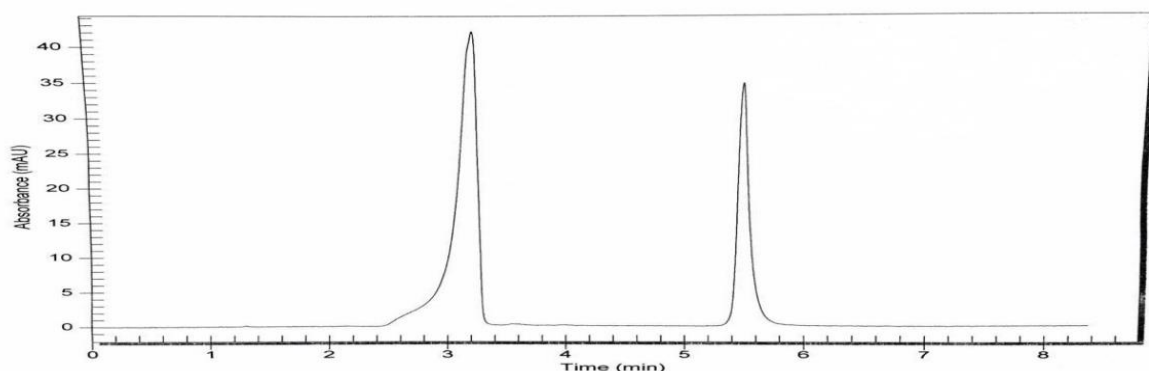
A figura 8 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v, vazão de 0,7 mL/min, injeção de 40 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 15 min. Este cromatograma separou melhor os dois ativos, porém, o primeiro pico, de AA, apresentou uma variação na base, e o segundo pico, de NIC está em uma faixa de absorbância muito pequena.

Figura 8 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v



A figura 9 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v, vazão de 0,8 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 15 min. Observa-se neste cromatograma que ambos os picos estão em uma faixa de absorbância muito pequena, além de a base do pico de AA apresentar assimetria frontal.

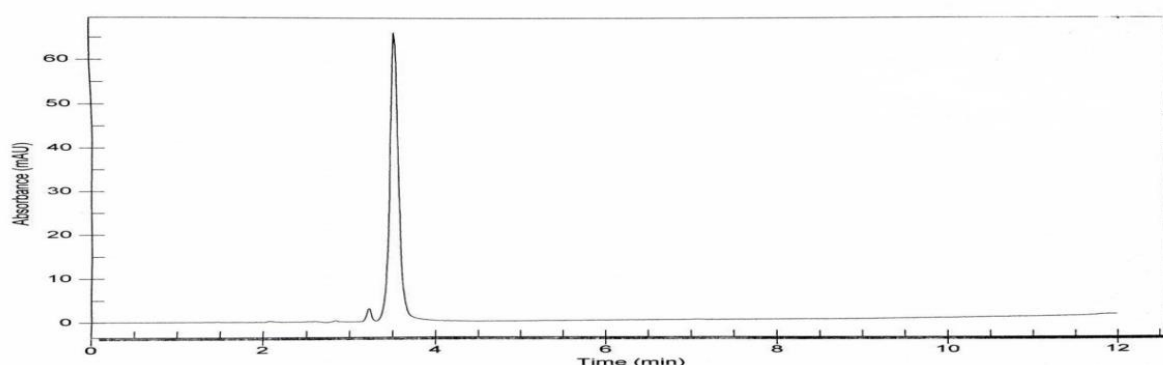
Figura 9 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (80:20) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v



A figura 10 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v no início da injeção e

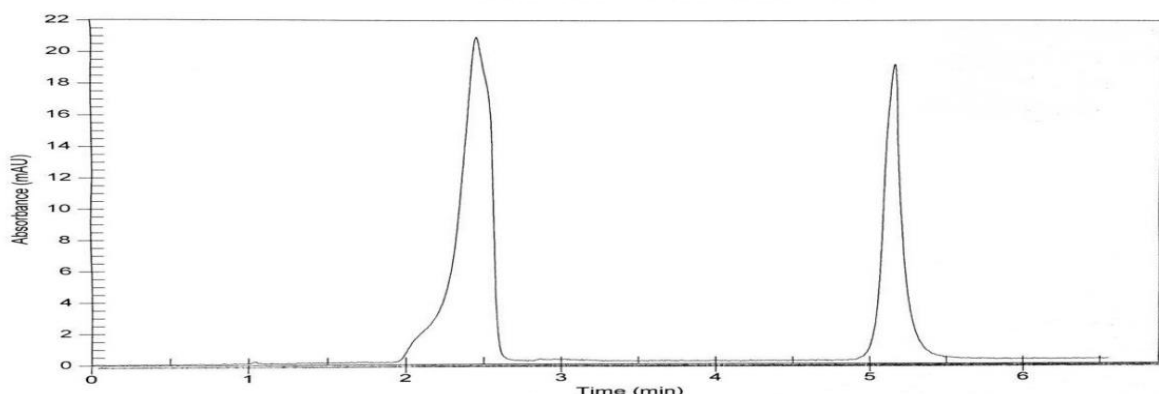
terminando com água e metanol (30:70) v/v, acidificado com 0,5% de ácido acético, vazão de 1,0 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 12 min. Nestas condições, os dois picos ficaram muito próximos e em uma faixa de absorbância muito pequena.

Figura 10 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (90:10) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (30:70) v/v



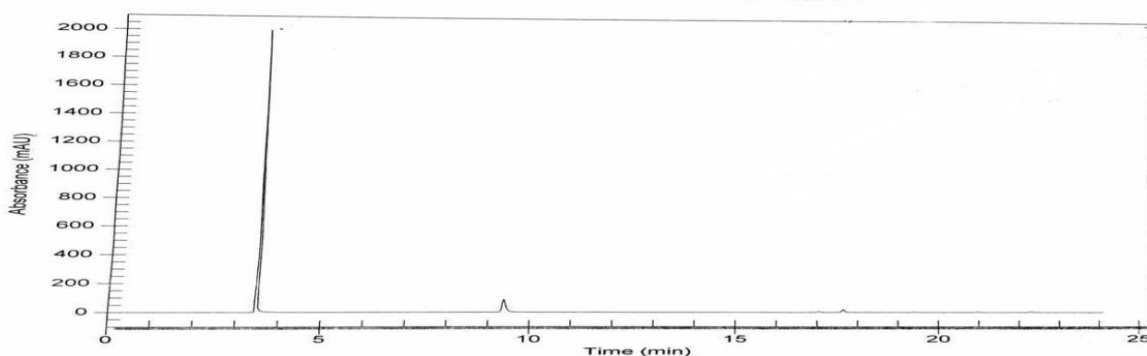
A figura 11 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (85:15) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v, vazão de 1,0 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 15 min. Assim como os anteriores, neste cromatograma, os picos obtidos apresentam assimetria frontal e estão em uma faixa de absorbância muito pequena.

Figura 11 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (85:15) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v



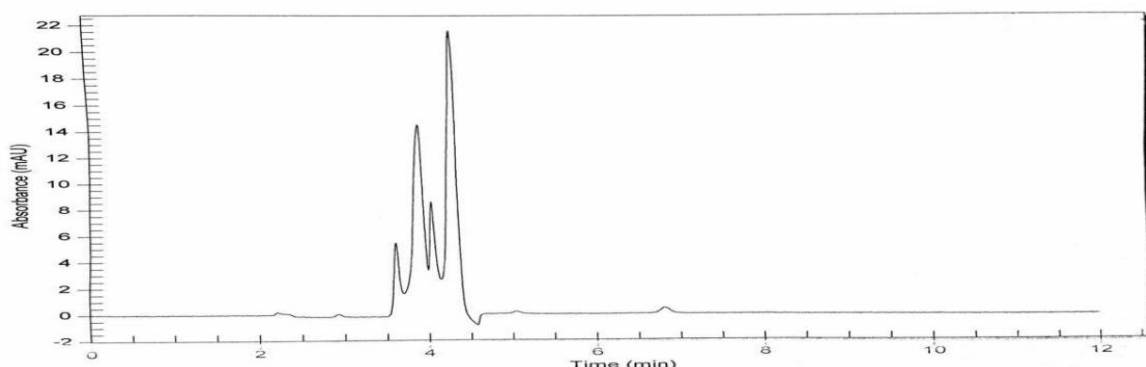
A figura 12 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (95:5) v/v no início da injeção e terminando apenas com metanol, vazão de 0,8 mL/min, injeção de 40 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 20 min. Com estas condições cromatográficas, o primeiro pico obtido apresenta um bom resultado, porém, o segundo pico está em uma faixa de absorbância muito pequena.

Figura 12 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água e metanol (95:5) v/v no início da injeção e terminando apenas com metanol



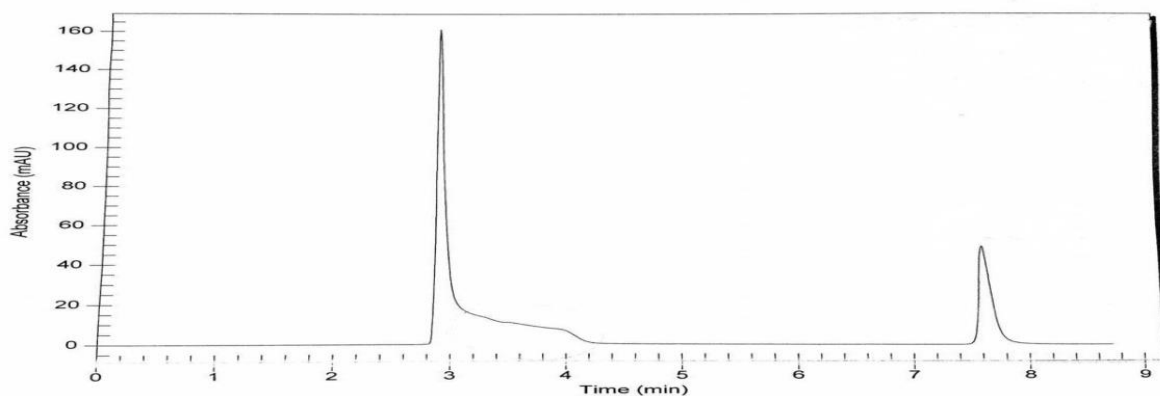
A figura 13 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel constituída por água acidificada com 2,5% de ácido acético e acetonitrila (95:5) v/v, vazão de 0,7 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 260 nm, com tempo de corrida de 15 min. Nesta corrida, o cromatograma apresentou diversos picos, talvez derivados de interferentes, o que impossibilita dizer quais picos correspondem aos ativos.

Figura 13 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída por água acidificada com 2,5% de ácido acético e acetonitrila (95:5) v/v



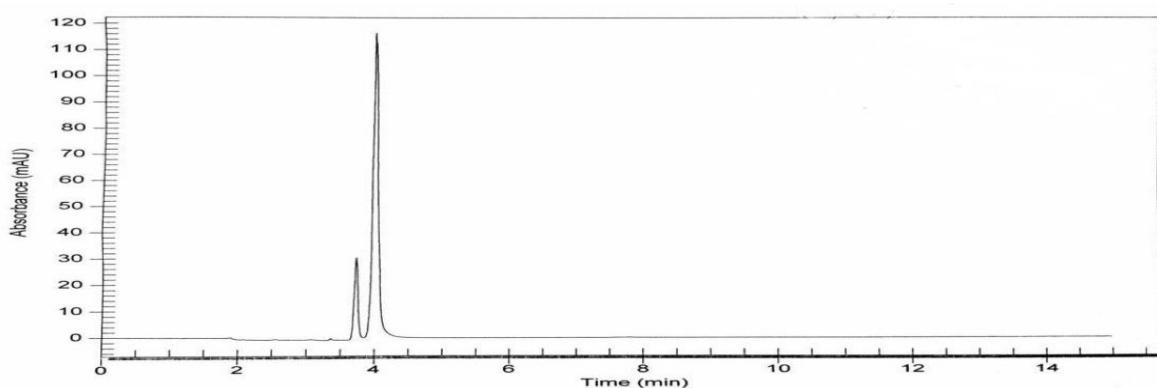
A figura 14 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída de água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (90:10) v/v no início da injeção e terminando com água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (40:60) v/v, vazão de 0,8 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 12 min. Ambos os picos obtido encontram-se em uma faixa de absorbância muito pequena, sendo que o segundo pico, de NIC, apresenta uma boa resolução, ao contrário do primeiro pico que se alargou na base.

Figura 14 – Cromatograma obtido com método gradiente de fase móvel constituída de água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (90:10) v/v no início da injeção e terminando com água acidificada com 0,1% de ácido acético e metanol (40:60) v/v



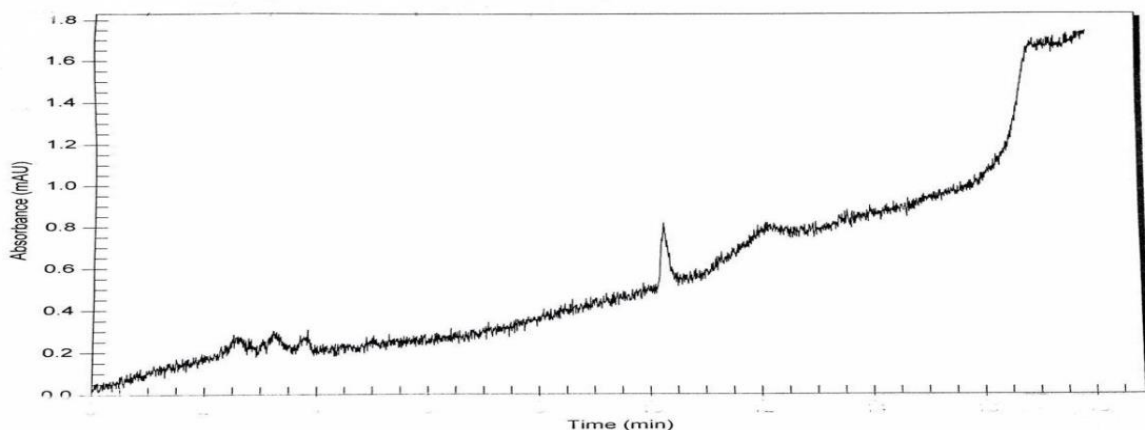
A figura 15 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel constituída de água acidificada com ácido acético a pH 2,6 e metanol (85:15) v/v, vazão de 0,8 mL/min, injeção de 40 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 15 min. Neste cromatograma, os picos obtidos apresentam boa resolução, porém, ambos apresentam tempo de retenção entre 3,5 e 4,0 minutos.

Figura 15 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel constituída de água acidificada com ácido acético a pH 2,6 e metanol (85:15) v/v



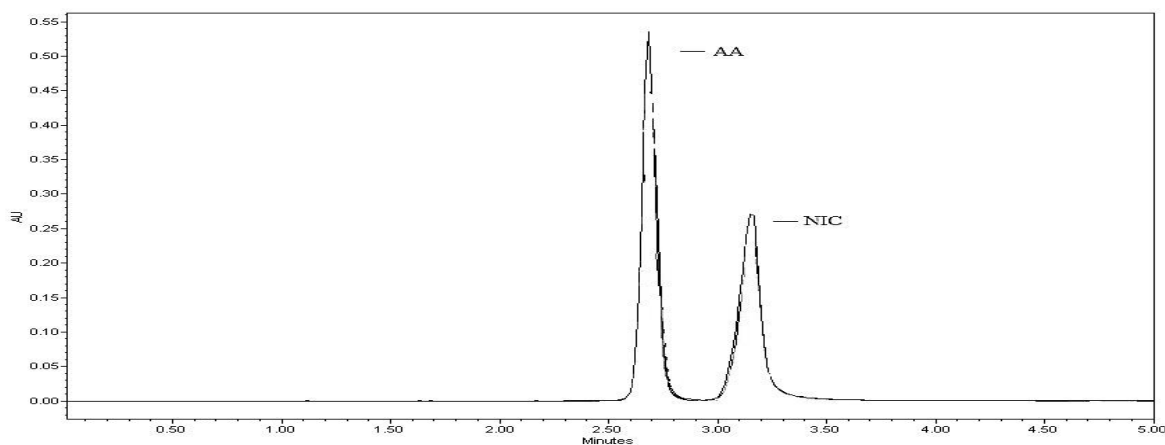
A figura 16 representa o cromatograma nas condições cromatográficas com método gradiente de fase móvel constituída por água e metanol (95:5) v/v no início da injeção e terminando com água e metanol (40:60) v/v, vazão de 0,8 mL/min, injeção de 20 μ L, detecção a 262 nm, com tempo de corrida de 12 min. Esta injeção foi realizada com uso de outra coluna, a coluna Phenomenex 11.

Figura 16 – Cromatograma obtido com coluna Phenomenex 11.



A figura 17 representa o cromatograma nas condições cromatográficas de fase móvel contendo 0,01% de ácido trifluoracético em água, coluna RP₁₈ (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), injeção de 20 µL, vazão de 1,7 mL/min, absorvância de 254 nm, corrida de 5 minutos. Por fim, esta condição cromatográfica apresentada corresponde ao melhor resultado obtido, com uso de solventes verdes, curto tempo de corrida e picos de alta resolução, sendo a condição cromatográfica de escolha para a quantificação de AA + NIC em emulsão.

Figura 17 – Cromatograma obtido com método isocrático de fase móvel contendo 0,01% de ácido trifluoracético em água



5.3. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos

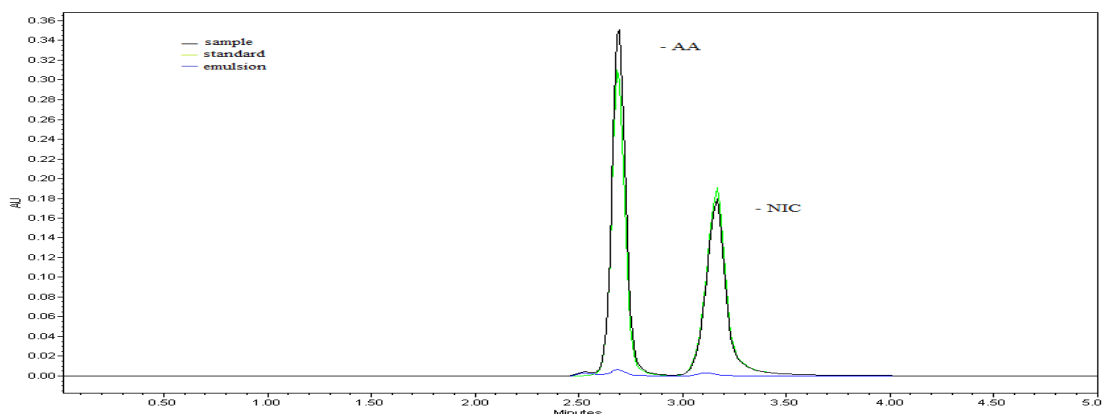
5.3.1. Validação do método de quantificação do ácido ascórbico e da nicotinamida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A partir do estudo preliminar e dos testes realizados com as diferentes fases móveis descritas anteriormente, foi possível determinar que a fase móvel composta por água com 0,01% de TFA, vazão 1,7 mL/min, detecção UV 254 nm e com volume de injeção de 20 μ L foi a ideal para quantificar os ativos, diminuir a assimetria do pico e gerar menos resíduos tóxicos. Desta forma, a validação pôde ser concluída.

5.3.1.1. Especificidade e Seletividade

Para análise da especificidade/seletividade, injetou-se o padrão, a base da emulsão e a emulsão com os ativos. Não foram obtidos picos concomitantes com os picos conhecidos de AA e NIC, portanto, a análise não possui interferentes. A figura 18 representa a injeção da emulsão base e amostra (emulsão contendo ativos) comparadas ao padrão de AA e NIC a 50 μ g/mL.

Figura 18 – Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 50 μ g/mL diluídas em água, vazão 1,7 mL/min, detecção a 254 nm, utilizando coluna RP₁₈ (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 μ m, Waters).



A seletividade foi testada a partir da indução de condições de estresse, visto que os produtos de degradação dos ativos não estão disponíveis no mercado e poderiam interferir nos picos dos cromatogramas, caso houvessem. Portanto, a solução padrão de AA + NIC na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi submetida à solução de hidróxido de sódio 0,1 M, solução de ácido clorídrico 0,1 M, solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes e água, todas a 80°C, além de luz ultravioleta a 25°C e estufa a 35°C, por um período de oito horas. Injetou-se cada solução citada anteriormente imediatamente após o período estipulado e os cromatogramas obtidos podem ser observados nas Figuras 19 a 24. Não foram observados picos de degradação interferentes na análise do AA e NIC nem próximos ao tempo de retenção de cada composto, evidenciando sua seletividade.

Figura 19 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 $\mu\text{g/mL}$), em HCl 0,1 M, a 80°C.

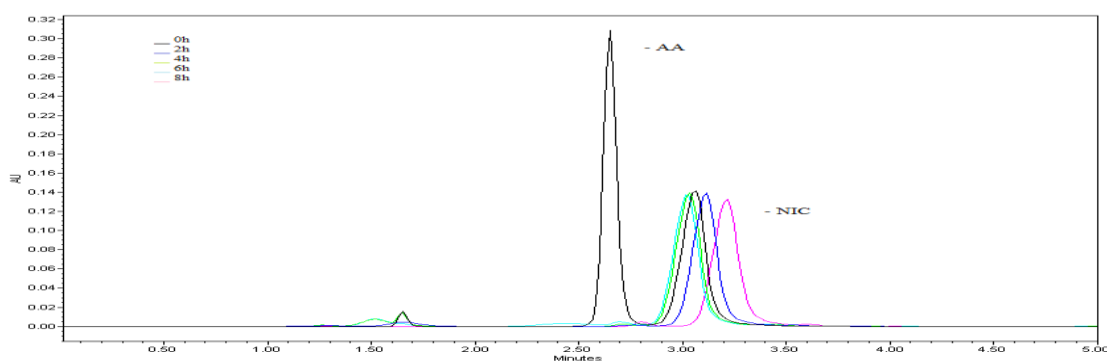


Figura 20 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 $\mu\text{g/mL}$), em NaOH 0,1 M, a 80°C.

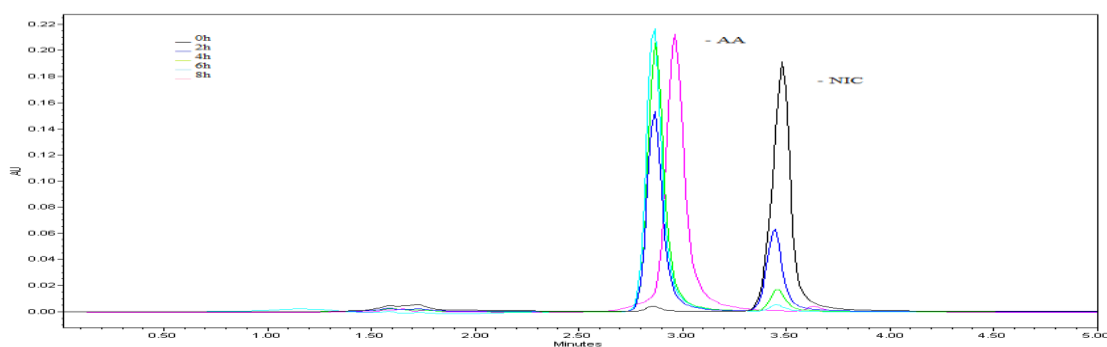


Figura 21 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 $\mu\text{g/mL}$), em H_2O_2 0,1 M, a 80°C.

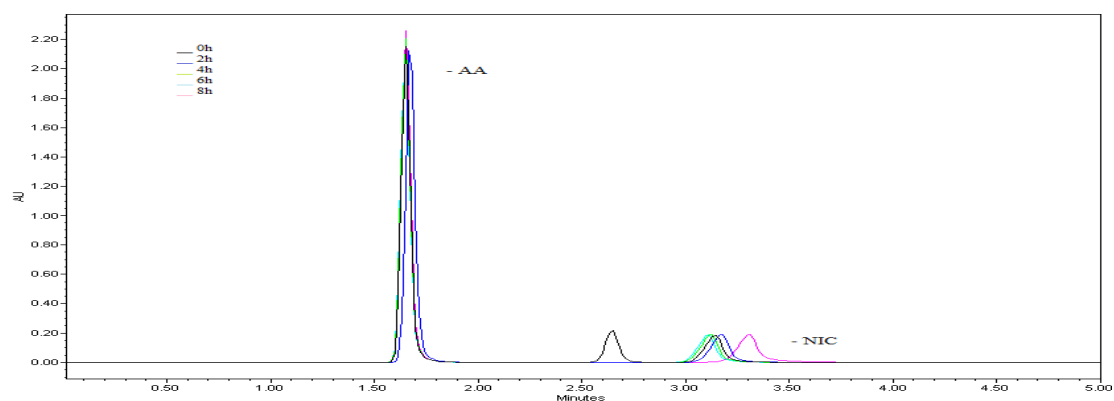


Figura 22 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 $\mu\text{g/mL}$), em água, a 80°C.

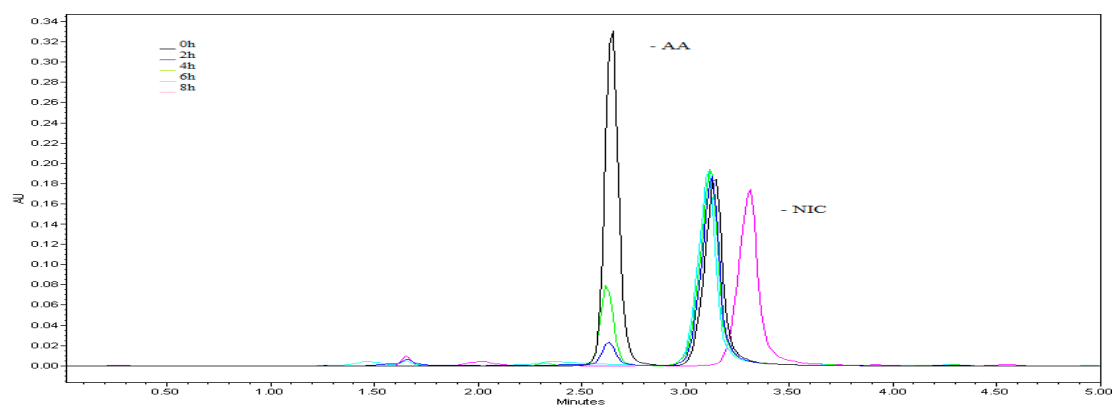


Figura 23 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 $\mu\text{g/mL}$), em luz UV, a 25°C.

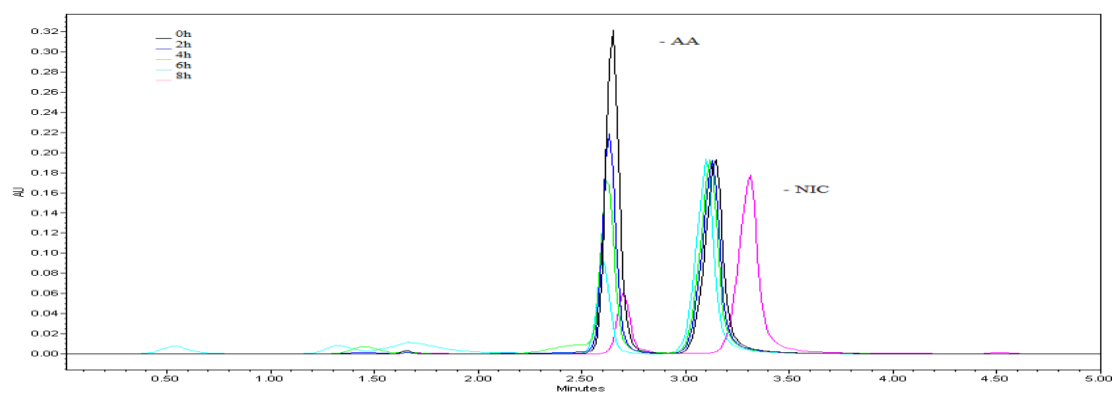
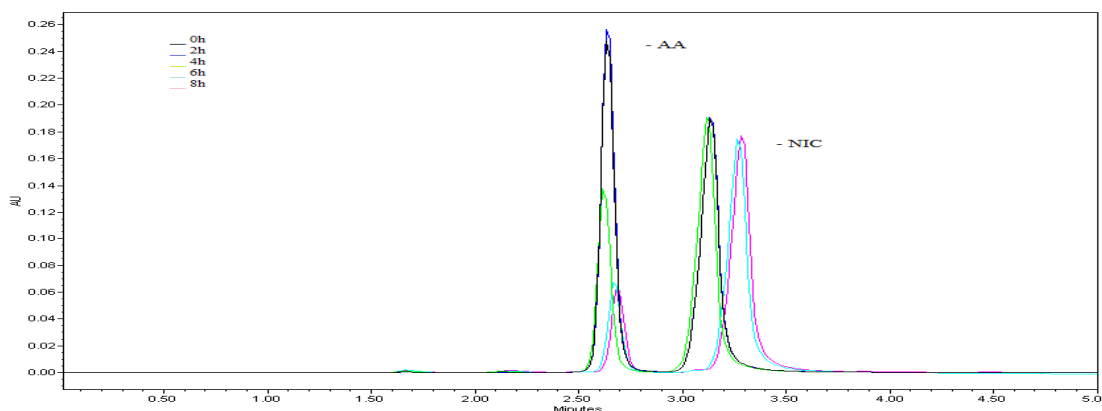


Figura 24 – Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AA + NIC (50 µg/mL), em água, a 30°C.



5.3.1.2. Linearidade

A partir de uma solução padrão de AA e NIC (200 µL/mL), realizou-se diluições utilizando água como solvente para que fossem obtidas soluções nas concentrações de 20 a 80 µg/mL. As áreas obtidas estão nas tabelas XIII e XIV.

Tabela XIII. Valores das áreas referentes ao pico de AA para a obtenção da curva analítica do método cromatográfico.

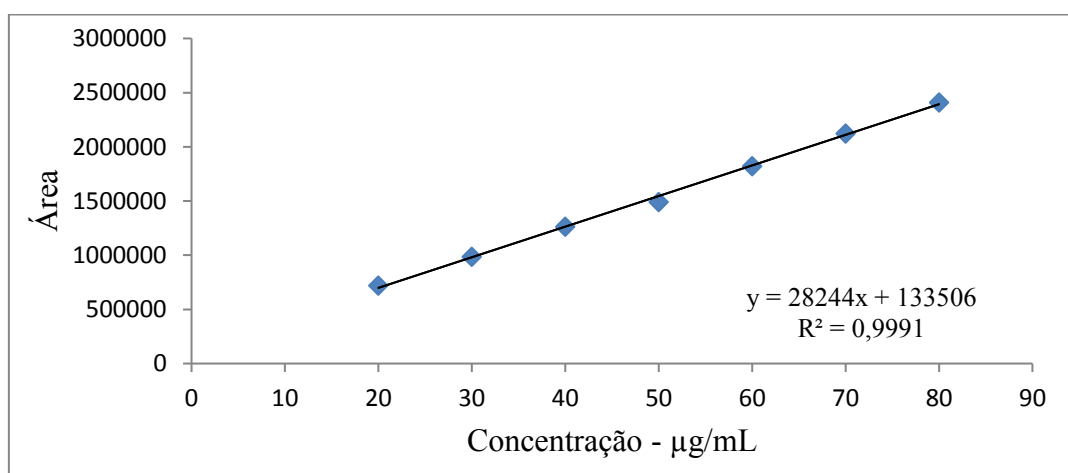
Concentração final µg/mL	1ª curva	2ª curva	3ª curva	Média	DP	DPR (%)
20	683322,3333	721955,6667	756236,0000	720504,6667	36478,4833	4,8658
30	975034,6667	1014944,3333	968682,6667	986220,5556	25077,4507	3,2528
40	1234712,3333	1320213,6667	1233556,3333	1262827,4444	49701,2873	3,9469
50	1469905,6667	1573703,0000	1433679,0000	1492429,2222	72678,4910	4,6495
60	1819156,6667	1887794,6667	1758982,0000	1821977,7778	64452,6553	3,1799
70	2154610,6667	2125431,3333	2094416,6667	2124819,5556	30101,6630	5,8911
80	2458999,3333	2407537,6667	2366945,3333	2411160,7778	46133,8263	5,1915

Tabela XIV. Valores das áreas referentes ao pico de NIC para a obtenção da curva analítica do método cromatográfico.

Concentração final µg/mL	1ª curva	2ª curva	3ª curva	Média	DP	DPR (%)
20	760667,6667	746059,6667	733193,6667	746640,3333	13746,2013	1,7260
30	942611,3333	946641,6667	941999,0000	943750,6667	2522,3300	1,3034
40	1151604,6667	1143758,3333	1144723,0000	1146695,3333	4278,8796	1,0462
50	1362301,6667	1364378,0000	1341327,0000	1356002,2222	12751,4470	1,0396
60	1569516,6667	1543586,6667	1523428,3333	1545510,5556	23104,3206	1,3737
70	1762077,0000	1700117,3333	1759206,0000	1740466,7778	34973,1170	1,9252
80	1973432,0000	1925024,0000	1909860,3333	1936105,4444	33202,9819	1,7307

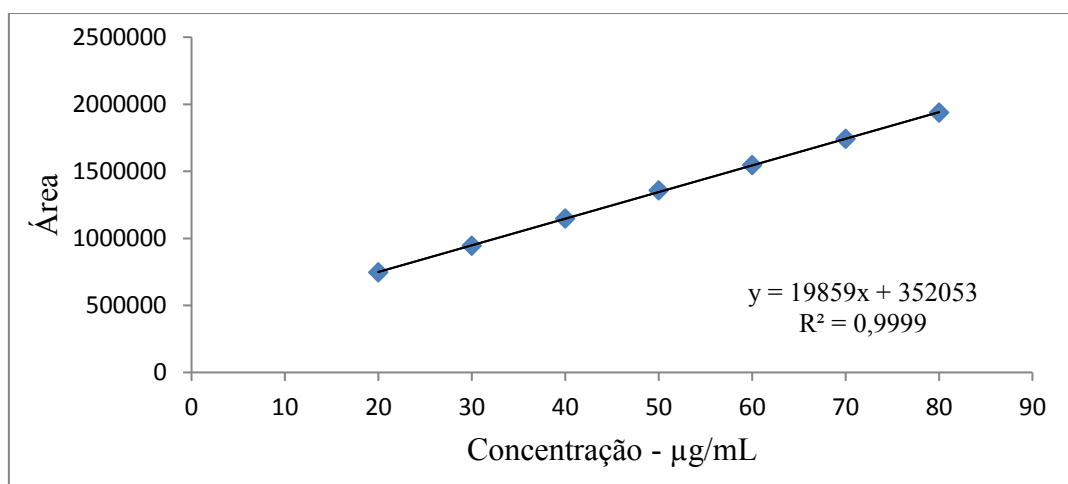
A curva analítica de AA mostrada na Figura 25 foi construída a partir da média dos valores de três curvas analíticas obtidas no estudo da linearidade, com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL. A equação da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 28244x + 133506$ com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9991.

Figura 25 – Curva analítica de AA obtida por CLAE.



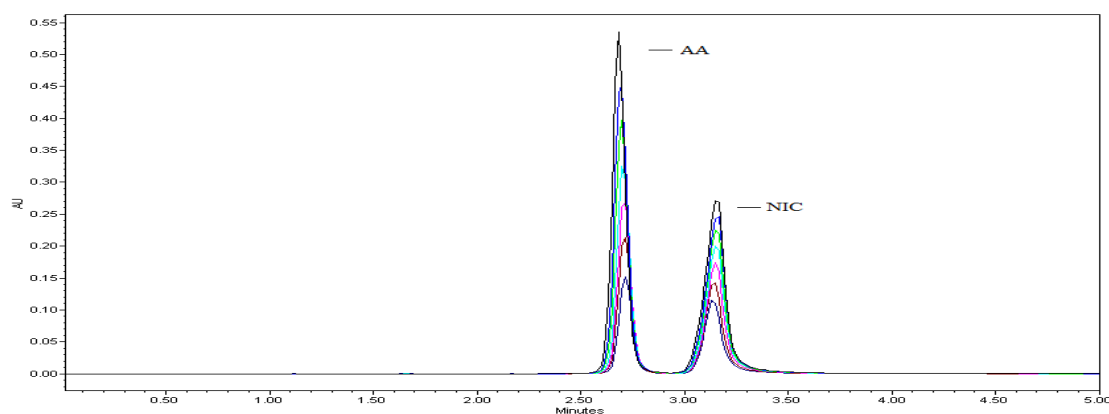
A curva analítica de NIC mostrada na Figura 26 foi construída a partir da média dos valores de três curvas analíticas obtidas no estudo da linearidade, com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 19859x + 352053$, com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9999.

Figura 26 – Curva analítica de NIC obtida por CLAE.



A Figura 27 mostra o cromatograma obtido a partir de sete concentrações diferentes de AA e NIC, com tempo de retenção de 2,7 min e 3,2 min, respectivamente.

Figura 27 – Sobreposição de sete cromatogramas da injeção de padrão nas concentrações de 20 a 80 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em água, vazão 1,7 mL/min, detecção a 254 nm, utilizando coluna RP₁₈ (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 μm , Waters).



5.3.1.3. Limite de detecção e de quantificação

Para o AA, os LDD e LDQ determinados foram 1,69 µg/mL e 5,14 µg/mL, respectivamente, enquanto que para a NIC, os LDD e LDQ determinados foram 2,21 µg/mL e 6,71 µg/mL, respectivamente, o que permite concluir que a primeira concentração utilizada na curva analítica é maior do que os valores encontrados, o que permite a detecção e a quantificação confiável dos ativos.

5.3.1.4. Precisão

A precisão foi baseada na repetibilidade, a qual demonstra a correlação das injeções em um mesmo dia, com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e o DPR obtido foi de 3,6% para o AA e de 3,7% para a NIC.

Já na avaliação da precisão intermediária do método, ou seja, realizada em dias e com analistas diferentes, o DPR obtido foi de 4,5% para o AA e de 2,2% para a NIC, ambos para o segundo analista, o que resulta no teste F sem diferença significativa entre os valores de absorbância encontrados entre os dois analistas, sendo $F_{cal} 0,57 < F_{tab} 4,28$ e $P_{valor} 0,25$ para o AA, e para a NIC, $F_{cal} 2,48 < F_{tab} 4,28$ e $P_{valor} 0,14$, provando a precisão do método proposto, como mostram as tabelas XV, XVI, XVII e XVIII.

Tabela XV. Precisão do método com diferentes analistas para o AA.

50 µL/mL	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Média	DPR (%)
Analista 1	1.173.041	1.157.115	1.072.963	1.193.545	1.190.982	1.144.270	1.133.320	1.152.176,5714	3,608 2
Analista 2	1.177.744	1.229.261	1.215.329	1.216.556	1.266.874	1.191.311	1.092.263	1.198.476,8571	4,570 1

Tabela XVI. Precisão do método com diferentes analistas para a NIC.

50 µL/mL	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Média	DPR (%)
Analista 1	1.018.855	982.334	913.174	1.020.835	1.015.200	988.673	990.128	989.885,5714	3,7756
Analista 2	1.037.457	1.058.538	1.039.457	1.027.989	1.099.520	1.064.610	1.051.142	1.054.101,8571	2,2500

Tabela XVII. Teste F da precisão intermediária para o AA.

	Analista 1	Analista 2
Média	1.152.176,571	1198476,857
Variância	1.728.299.114	2.999.877.842
Observações	7	7
Gl	6	6
F	0,576123164	
P(F≤f) uni-caudal	0,259765434	
F crítico	4,283865714	

Tabela XVIII. Teste F da precisão intermediária para a NIC.

	Analista 1	Analista 2
Média	989.885,5714	1.054.101,857
Variância	1.396.855.956	562.512.217,1
Observações	7	7
Gl	6	6
F	2,483245543	

P(F≤f) uni-caudal	0,146423709
F crítico	4,283865714

5.3.1.5. Exatidão

A confirmação da exatidão do método foi feita a partir da determinação das recuperações médias através do método de adição de padrão (50 µL), com três níveis de concentração 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3). O método desenvolvido apresentou-se adequado para quantificação de AA e NIC em emulsão porque a porcentagem de recuperação encontra-se entre 95-105%, como mostram as tabelas XIX e XX.

Tabela XIX. Exatidão do método para análise de emulsão contendo AA.

	AA adicionado (µg/mL)	AA encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%) <i>n</i> = 3
R1	42	43,64	104,01	100,52	0,89
R2	50	50,40	100,80		
R3	58	56,11	96,74		

Tabela XX. Exatidão do método para análise de emulsão contendo NIC.

	NIC adicionada (µg/mL)	NIC encontrada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%) <i>n</i> = 3
R1	42	43,66	103,96	100,03	0,83
R2	50	49,89	99,77		
R3	58	55,89	96,37		

Além da recuperação média obtida ter sido adequada, não houveram variações maiores do que 5%, o que evidencia a proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais nos ensaios realizados (BRASIL, 2003).

5.3.1.6. Robustez

O método teve sua robustez avaliada pela modificação da taxa de fluxo da fase móvel, volume de injeção e fonte da água da fase móvel. O DPR obtido foi inferior a 5% para ambos os ativos, o que indica que o método é robusto, desde que os resultados obtidos com pequenas mudanças no método não apresentem variações significativas, o que mostra a tabela XXI.

Tabela XXI. Valores obtidos na avaliação da robustez do Protocolo de HPLC para análise de AA e NIC.

Variável	Faixa investigada		AA (%)	DPR (%)	NIC (%)	DPR (%)
Taxa de fluxo da fase móvel	1,65		102,68	3,9280	101,09	3,1580
	1,70		100		100	
	1,75		95,00		95,22	
Volume de injeção (µL)	18		104,79	4,4259	98,95	0,9831
	20		100		100	
	22		95,92		100,91	
Fonte da água da fase móvel	Lab. Controle	de	100	3,2515	100	0,3195
	Qualidade					
	Lab. Farmacotécnica		95,50		100,45	

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A emulsão contendo AA + NIC foi desenvolvida para que pudesse ser utilizada na quantificação dos mesmos no HPLC-UV. Através de ajustes, foi possível obter uma emulsão de modo que a viscosidade não fosse perdida quando adicionados os ativos. Estes foram solubilizados em água e adicionados à emulsão já preparada, minutos antes da utilização da mesma para que não houvesse qualquer tipo de degradação.

O método foi desenvolvido e validado com o uso de água e ácido trifluoracético como solventes, sendo estes solventes verdes, o que diminui a agressão ao meio ambiente e a produção de resíduos tóxicos, além de ser uma fase móvel ainda não utilizada por nenhum outro método proposto na literatura científica, como mostra a tabela XI. Após selecionadas as melhores condições de taxa de fluxo da fase móvel, volume de injeção, comprimento de onda e outras condições cromatográficas, o método se mostrou muito eficaz para quantificação de AA e NIC em emulsão, apresentando vantagens como facilidade, rapidez e baixo custo.

A avaliação dos resultados obtidos no ensaio de linearidade demonstrou uma correlação entre a absorbância das soluções de AA e NIC e as concentrações de 20-80 µg/mL utilizadas. A equação da reta determinada pelo método dos mínimos quadrados para o AA foi $y = 28244x + 133506$ e, para a NIC, $y = 19859x + 352053$, com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9991 para o AA e 0,9999 para NIC.

Os limites de detecção e quantificação foram gerados a partir da curva de calibração feita em dias diferentes. Para o AA, os LDD e LDQ determinados foram 1,69 µg/mL e 5,14 µg/mL, respectivamente, enquanto que para a NIC, os LDD e LDQ determinados foram 2,21 µg/mL e 6,71 µg/mL, respectivamente, mostrando que a primeira concentração usada na curva analítica é maior do que os valores encontrados, viabilizando a detecção e quantificação dos compostos.

A precisão foi baseada na repetibilidade, e o DPR obtido foi de 3,6% para o AA e de 3,7% para a NIC. Já na avaliação da precisão intermediária do método, o DPR obtido foi de 4,5% para o AA e de 2,2% para a NIC, ambos para o segundo analista.

O método teve sua robustez avaliada pela modificação da taxa de fluxo da fase móvel, volume de injeção e fonte da água da fase móvel. O DPR obtido foi inferior a 5% para ambos os ativos, o que indica que o método é robusto.

A confirmação da exatidão do método foi feita a partir da determinação das recuperações médias através do método de adição de padrão (50 µg). O método desenvolvido apresentou-se adequado para quantificação de AA e NIC em emulsão uma vez que a porcentagem de recuperação encontra-se entre 95-105%.

O método de HPLC-UV proposto demonstrou-se adequado frente a todos os parâmetros avaliados e, portanto, pôde ser validado para a quantificação de AA e NIC em emulsão.

Em comparação com outros métodos analíticos existentes para quantificação dos ativos separadamente, este apresenta vantagens como fácil execução, baixo custo e uso de solventes verdes. Além disso, este método pode ser facilmente aplicado no controle de qualidade de AA e NIC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 03 mar. 2016.

Anyakora, C.; Afolami, I.; Ehianeta, T.; Onwumere, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 2(2). pp. 029-036, April, 2008.

Aranha, F. Q.; Moura, L. S. A.; Simões, M. O. S.; Barros, Z. F.; Quirino, I. V. L.; Metri, J. C.; Barros, J. C.; *Rev. Nutr.* 2004, 17, 309. 6.

Baierle, M., *et al.* Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 2, 403-407, 2012.

Barbosa, K. B. R., *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* vol.23 no.4 Campinas July/Aug. 2010 .

Barcia, M. T., *et al.* Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. *Ciências de Alimentos*.

Berger NA (1985). Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.* 101: 4-15.

Bissett DL, Miyamoto K, Sun P, Li J, Berge CA. Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin. *Int J Cosmet Sci.* 2004; 26(5):231-8.

Brito, N.M.; Junior, O.P.A.; Polese, L.; Ribeiro, M.L.. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

Buettner, G. R.; *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 300, 535.

Burgess C. Topical Vitamins. *J Drugs Dermatol.* 2008; 7 (7 Suppl):2-6.

Chen, Q. I.; Espey, M. G.; Sun, A. Y.; Levine, M.; *Free Radical Biol. Med.* 2008, 80, 203.

Chung, W. Y.; Chung, J. K. O.; Szeto, Y. T.; Tomlinson, B.; *Clin. Biochem.* 2001, 34, 623.

Costa, M. J. C.; Terto, A. L. Q.; Santos, L. M. P.; Rivera, M. A. A.; Moura, L. S. A.; *Rev. Nutr.* 2001, 14, 13.

Couto, M. A. L.; Canniatti-Brazaca, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

Deaton, C. M.; Marlin, D. J.; *Clinical Techniques in Equine Practice* 2003, 2, 278.

Donato, E. M.; Zanotto, A. R.; Bergold, A. M. Ion-pair HPLC applied to the assay of the vitamin B group mixture: theoretical bases and method validation. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* vol.40 no.3 São Paulo July/Sept. 2004.

Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). *J Lab Clin Med* 1991; 118: 3-4.

Fantini, A. P.; Brazaca-Canniatti, S. G.; Souza, M. C.; Mansi, D. N.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008, 28, 435.

Farooqui M.Y.H.; Day W.W.; Zamorano D.M. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Comp Biochem Physiol* 1987; 88B: 177-80.

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 43, n. 1, Mar. 1997.

Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme. *Nature*, v.408, p.239, 2000.

Freire, J. M., *et al.* Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.12, p.2291-2296, dez, 2013.

Gehring W. Nicotinic acid/niacinamide. *J Cosmet Dermatol.* 2004;3(2):88-93.

Hadshiew, M. I.; Eller, M. S.; Gilchrest, B. A. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. *Am. J. Contact Dermat.*, v.11, n.1, p.19-25, 2000.

Halliwell B.; Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon; 1989.

Halliwell B.; Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.

Halliwell B.; Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55.

Hassan, G. I.; Onu, A. B.; *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 2006, 6, 293.

Huang HY.; Appel L.J.; Croft K.D.; Miller E.R.; Mori T.A.; Puddey I.B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3): 549-55.

Janeb, M.; Bingham, S.; Ferrari, P.; Friesen, M. D.; Al-Delaimy, W. K.; Luben, R.; Wareham, N.; Khaw, K. T.; Riboli, E.; *Câncer Epidemiol. Biomarkers Prevention* 2005, 14, 1837.

Kand'ár, R.; Záková, P.; *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3503.

Karlsen, A.; Blomhoff, R.; Gundersen, T. E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 824, 132.

Kawada A.; Konishi N.; Oiso N.; Kawara S.; Date A. Evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing niacinamide. *J Dermatol.* 2008;35(10):637-42.

Klimczak, I.; Malecka, M.; Szlachta M.; Gliszczynska-Swiglo A.. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

Koury J.C.; Donangelo C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16(4):433-41.

Lee, S. H.; Oe, T.; Blair, I. A.; *Science* 2001, 292, 2083.

Levine, M.; Wang, Y.; Padayatty, S. J.; Morrow, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 9842.

Lykkesfeldt, J.; Lxft, S.; Poulsen, H. E.; *Anal. Biochem.* 1995, 282, 329.

Lykkesfeldt, J.; Lxft, S.; Nielsen, J. B.; Poulsen, H. E.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention* 2007, 16, 2513.

Malta, M. B.; Carvalhaes, M. A. B. L.; Parada, C. M. G. L.; Corrente, J. E.; *Rev. Bras. Epidemiol.* 2008, 11, 573.

Manela-Azulay, M. Vitamina C. *An. Bras. Dermatol.* vol.78 no.3 Rio de Janeiro May/June 2003.

Margolis, S. A.; Davis, T. P.; *Clin. Chem.* 1988, 34, 2217.

McCormick DB (1996). Co-enzymes, Biochemistry of. In: *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, Meyers RA, ed. Weinheim: VCH. 1:396-406.

Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J* 1983; 218: 273-5.

Myint, P. K.; Luben, R. N.; Welch, A. A.; Bingham, A. S.; Wareham, N. J.; Khaw, K. T.; Am. J. Clin. Nutr. 2008, 87, 64.

Naidu, K. A.; Nutr. J. 2003, 2, 7. 5.

Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D.; Trends Anal. Chem. 2008, 27, 942.

Paniz C.; Bairros A.; Valentini J.; Charao M.; Bulcao R.; Moro A, *et al.* The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women. Clin Biochem. 2007; 40(18):1367-72.

Pellegrini, N. et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.

Pimentel, C. V. M. B.; Francki, V. M.; Gollücke, A. P. B. Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.

Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K.; Ravi, M. N. V.; J. Controlled Release 2006, 113, 189.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sci. 2009;84:705-12.

Roesler, R; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Holanda, R.B.; Sousa, C.A.S.; Pastore, G.M.. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(1): 53-60, jan.-mar. 2007.

Rosa, J. S.; Godoy, R. L. O.; Neto, J. O.; Campos, R. S.; Matta, V. M.; Freire, C. A.; Silva, A. L.; Souza, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007.

Santiago A, Chaves E, Oliveira M, et al. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. Biochimie. 2008;90:1566-77.

Scharfetter-koshanek, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Blaudschun, R.; Wenk, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. Biol. Chem., v.387, n.11, p.1247–1257, 1997.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. RBME. 2004; 10(10):308-13.

Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. Rev Nutr. 2004; 17(2):227-36.

Simon, J. A.; Hudes, E. S.; J. Am. Coll. Nutr. 1998, 17, 250.

Spagnol, C.M., Isaac, V.L.B., Corrêa, M.A., Salgado, H.R.N.; Validation of HPLC–UV Assay of Caffeic Acid in Emulsions; Journal of Chromatographic Science, 2016, Vol. 54, No. 3, 305–311.

Vinci, G.; Botre, F.; Ruggieri, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. Food Chemistry, London, v. 53, n. 2, p. 211-214, 1995.

Wang, S.; Geraci, G.; Kuhlmann, M. K.; Levin, N. W.; Handelman, G. J.; Nephrol. Dial. Transplant. 2008, 23, 120.

Welch, R. W.; Wang, Y.; Crossman junior, A.; Park, J. B.; Kirk, K. L.; Levine, M. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. 1995. In: MANELA-AZULAY, M.; FILGUEIRA, A. L.; PÉREZ, M. A.; MANDARIN-DE-LACERDA, C. A.; CUZZI, T. Vitamina C*. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 265-274, 2003.

Yu, B. P. Cellular Defenses against Damage from Reactive Oxygen Species. Physiol Rev, v.74, n.1, p.139-162. 1994.

DADOS FINAIS

Araraquara, 09 de janeiro de 2017.

Camila Jandira Martins

De acordo:

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa