

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” – UNESP**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ARARAQUARA

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA TIROSINASE E
ESTUDO DE ESTABILIDADE DE EMULSÃO CONTENDO ÁCIDO
ASCÓRBICO E NICOTINAMIDA**

SARA HAYAMA ARIMORI

ARARAQUARA – SP

2016

SARA HAYAMA ARIMORI

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA TIROSINASE E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE EMULSÃO CONTENDO ÁCIDO ASCÓRBICO E NICOTINAMIDA

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.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Co-orientadora: Me. Caroline Magnani Spagnol

ARARAQUARA – SP

2016

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, pois sem ele não vivenciaria este momento especial. Aos meus pais, Regina e Roberto, ao meu irmão Niki e ao meu namorado Rodrigo. Por todo esforço, apoio e paciência que sempre tiveram comigo.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pelos ensinamentos e sabedoria durante a minha graduação e estágio.

À co-orientadora, Me. Caroline Magnani Spagnol, pela paciência e todo conhecimento proporcionado para a realização deste trabalho.

À minha família, que apesar de minha ausência, estiveram sempre presentes e nunca faltou apoio durante toda minha vida.

Às minhas amigas Mayra, Débora, Patrícia, Anna Carolina e Celina, pela amizade, que levarei para a vida inteira.

À técnica do Laboratório de Cosmetologia, Ilza Yogui, pela ajuda e companhia durante a realização de meus experimentos.

A todos os professores, que de alguma forma, compartilharam seus conhecimentos comigo.

Aos outros laboratórios que realizei experimentos, por compartilhar os equipamentos para a realização da minha pesquisa.

RESUMO

Diante da preocupação com os cuidados estéticos e as possíveis doenças de pele, o uso de produtos cosméticos com a finalidade de precaver ou minimizar os danos causados, principalmente pela exposição ao sol, estão crescendo diariamente. E as emulsões contendo ativos, como por exemplo, Ácido ascórbico e Nicotinamida são produzidos com este intuito, tendendo serem adotados pelos consumidores. No entanto, é essencial ter a eficácia e segurança do produto a ser comercializado. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade inibidora da tirosinase, estudar a estabilidade das formulações contendo ou não os princípios ativos, estudar o comportamento reológico das emulsões e determinar o teor dos princípios ativos nas formulações. Os estudos realizados incluíram as avaliações da atividade inibidora da tirosinase, da estabilidade acelerada considerando as características organolépticas como cor, odor, aspecto, além das características físico-químicas, como valor de pH, densidade, do comportamento reológico e a determinação dos princípios ativos. O ácido ascórbico apresentou uma elevada atividade inibidora da tirosinase, no entanto a nicotinamida não a apresentou. Considerando o estudo da estabilidade acelerada, apesar das formulações terem sido submetidas a várias condições de estresse, os princípios ativos não influenciaram na estabilidade física do produto, mas a estabilidade química foi afetada. Na determinação dos princípios ativos foi observado que a temperatura foi um fator importante para a estabilidade, já que a altas temperaturas houve a degradação dos princípios ativos.

Palavras-chaves: Despigmante, emulsão, estabilidade, reologia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da melanogênese Fonte: Petit et al., 2003	10
Figura 2 - Estrutura química do ácido ascórbico Fonte: BRASIL, 2010.	11
Figura 3 - Estrutura química da nicotinamida Fonte: Inamadugu et al., 2010.....	11
Figura 4 - Placa de 96 poços referente à determinação da inibição da tirosinase pelo AA. Fonte: Próprio autor	19
Figura 5 - Perfil de inibição da tirosinase pelo AA.....	19
Figura 6- Fotografia do teste de centrifugação da formulação sem ativos (esquerda) e com ativos (direita). Fonte: Próprio autor.....	22
Figura 7 - Fotografias da formulação com ativos (F1) (A) e sem ativos (F2) (B) 24h após a manipulação nas condições de armazenamento -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz (respectivamente). Fonte: Próprio autor.....	22
Figura 8 - Fotografia da formulação com ativos (F1) (A) e sem ativos (F2) (B) no 90º dia de análise nas condições de armazenamento -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz (respectivamente). Fonte: Próprio autor.....	22
Figura 9 - Valores de pH da fórmula com ativos (F1) a condições de estresse durante 90 dias de análise.	24
Figura 10 – Valores de pH da fórmula com ativos (F1) a condições de estresse durante 90 dias de análise.	24
Figura 11 - Densidade da fórmula com ativos (F1) mantida em diferentes condições durante 90 dias de análise.	25
Figura 12 - Densidade da fórmula sem ativos (F2) mantida em diferentes condições durante 90 dias de análise.	25
Figura 13 - Curva de fluxo da formulação com ativos a -5°C.	27
Figura 14 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a -5°C.....	27
Figura 15 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 5°C	28
Figura 16 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 5°C.....	28
Figura 17 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 25°C.....	29
Figura 18 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 25 °C.....	29
Figura 19 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 45°C.....	30
Figura 20 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 45°C.....	30
Figura 21 - Curva de fluxo da formulação com ativos exposta à luz.....	31
Figura 22 - Curva de fluxo da formulação sem ativos exposta à luz	31
Figura 23 - Curva da viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a -5°C.....	33
Figura 24 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a -5°C	33
Figura 25 - Curva da viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 5°C	33
Figura 26 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a 5°C	34
Figura 27 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 25°C	35
Figura 28 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a 25°C	35
Figura 29 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 45°C	36
Figura 30 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 45°C	36
Figura 31 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos exposta à luz	37
Figura 32 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos exposta à luz.....	37
Figura 33 - Varredura de tensão das formulações a -5°C.....	38
Figura 34 - Varredura de tensão das formulações a 5°C	38
Figura 35 - Varredura de tensão das formulações a 25°C	39

Figura 36 - Varredura de tensão das formulações a 45°C	39
Figura 37 - Varredura de tensão das formulações expostas à luz	40
Figura 38 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a -5°C.....	40
Figura 39 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 5°C	41
Figura 40 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 25°C	41
Figura 41 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 45°C	42
Figura 42 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações expostas à luz	42
Figura 43 - Ensaio de fluência e relaxação das formulações com ativos nos dias 1 e 90, em todas as condições.....	43
Figura 44 - Ensaio de fluência e relaxação das formulações sem ativos nos dias 1 e 90, em todas as condições.....	43
Figura 45 – Cromatograma de NIC e AA	44
Figura 46 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a -5°C	44
Figura 47 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 5°C.....	45
Figura 48 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 25°C.....	45
Figura 49 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 45°C.....	46
Figura 50 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação exposta à luz	46
Figura 51 - Gráficos comparativos das concentrações das formulações F1 e F3	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição percentual das formulações	15
Tabela 2 - Composição percentual das fórmulações	19
Tabela 3 - Valores da viscosidade aparente e área de histerese da formulação com ativos submetidas a -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz.....	32
Tabela 4 - Valores da viscosidade aparente e área de histerese da formulação sem ativos submetidas a -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz.....	32

LISTA DE ABREVEATURAS

AA: Ácido ascórbico
Abs: Absorbância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT: Hidroxitolueno butilado
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DOPA: Diidroxifenilalanina
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
Hz: Hertz
IC₅₀ Concentração inibitória 50%
IV: Infravermelho
L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina
Min: minuto
NIC: Nicotinamida
Pa: Pascal
pH: Potencial hidrogeniônico
rpm: Rotação por minuto
s: Segundo
TFA: Ácido trifluoroacético
UV: Ultravioleta
v/v: Volume por volume

Sumário

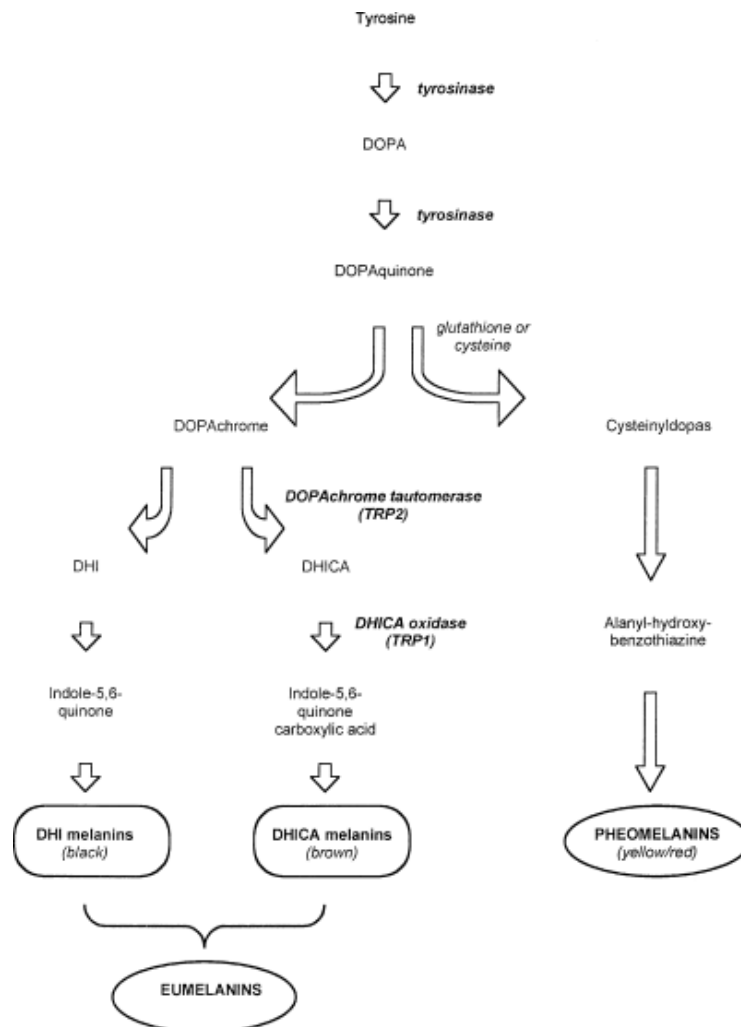
1. Introdução.....	10
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Material e métodos.....	14
Material	14
Equipamentos	14
Métodos.....	14
3.1. Determinação da atividade inibidora da tirosinase	14
3.2. Preparo das formulações	15
3.3. Avaliação da Estabilidade	16
3.3.1. Teste de centrifugação.....	16
3.3.2. Avaliação macroscópica.....	16
3.3.3. Determinação do pH	17
3.3.4. Densidade	17
3.4. Avaliação do comportamento reológico	17
3.5. Determinação do teor dos princípios ativos	18
4. Resultados e discussão	18
4.1. Determinação da atividade inibidora da tirosinase	18
4.2. Preparo das formulações	19
4.3. Avaliação da estabilidade.....	21
4.3.1. Teste de centrifugação.....	21
4.3.2. Avaliação macroscópica.....	22
4.3.3. Determinação do pH	23
4.3.4. Densidade	24
4.4. Avaliação do comportamento reológico	25
4.5. Determinação do teor dos princípios ativos	44
5. Conclusão	48
Referências Bibliográficas	50

1. Introdução

Atualmente, com a valorização nos padrões estéticos, há grande preocupação da população principalmente em relação à pele (SON & HEO, 2013). A intensa exposição ao sol, pode desencadear algumas doenças que a agride, como melasma, hiperpigmentação pós-inflamatória e lentigem senil (HAKOZAKI et al., 2002).

Porém, há tratamentos tópicos que se destinam inibir os processos enzimáticos da produção de pigmentos dentro dos melanócitos (VASHI & KUNDU, 2013). A melanogênese ocorre dentro dos melanócitos, que são encontrados na camada basal da epiderme. (NICOLETTI et al., 2002). A figura 1 ilustra esquematicamente a melanogênese.

Figura 1 - Representação esquemática da melanogênese Fonte: Petit et al., 2003

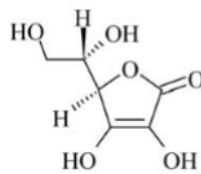


Os primeiros passos na via da biossíntese da melanina são a hidroxilação da tirosina para L-DOPA e a oxidação da L-DOPA para dopaquinona (PARVEZ et al., 2006). Estas reações são catalisadas pela tirosinase, uma enzima cobre-dependente, que regula a melanogênese e é considerada um potente alvo para novos agentes inibidores para doenças de

pele (HASSAN et al., 2016). Muitos agentes terapêuticos podem ser usados para o tratamento de hiperpigmentações, como o ácido ascórbico (AA) pela ação inibitória na melanogênese e a nicotinamida (NIC), forma ativa biológica da vitamina B3(CHOI et al., 2010).

O ácido ascórbico (Figura 2) tem a fórmula molecular $C_6H_8O_6$ e se caracteriza como um pó fino, cristalino branco e facilmente solúvel em água (BRASIL, 2010). Esta vitamina tem sido usada em produtos cosméticos e dermatológicos pelos seus benefícios para a pele. Além da função antioxidante, também tem a capacidade de suprimir a pigmentação da pele e a decomposição da melanina (SEGALL & MOYANO, 2008). No entanto, as formulações tópicas desta vitamina tendem a ser ineficazes devido à sua baixa estabilidade em exposição à luz e altas temperaturas de armazenamento (DALCIN et al., 2003).

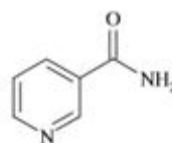
Figura 2 - Estrutura química do ácido ascórbico Fonte: BRASIL, 2010.



Alguns métodos de quantificação que podemos citar são: método de reação redox, método de titulação, método de derivação, método enzimático, além de métodos espectrofotométricos, fluorescência, quimioluminescência e eletroquímicos (TRANG, 2013).

A NIC (Figura 3) é a forma hidrossolúvel da vitamina B3 (ROLFE, 2014). Alguns artigos sugerem que a NIC pode ter vários efeitos sobre a pele como agente anti-inflamatório na acne, como antioxidante e fotoimunossupressor (HAKOZAKI et al., 2002). Além disso, pode reduzir a pigmentação, pelo impedimento da transferência dos melanossomas de melanócitos para os queratinócitos, sendo um componente importante em cremes de despigmentante (VASHI & KUNDU, 2013).

Figura 3 - Estrutura química da nicotinamida Fonte: Inamadugu et al., 2010



Emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis resultantes da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si estabilizados por um agente emulsificante. Essas formas farmacêuticas são muito utilizadas em cosméticos devido às suas características emolientes e

cremosas, garantindo grande aceitação por parte dos consumidores (PIANOVSKI et al., 2008). No desenvolvimento de uma emulsão cosmética, além do aspecto estético da formulação, o delineamento das propriedades físicas e da estabilidade é fundamental (LIMA et al., 2008).

Pelo perfil de estabilidade do produto é possível avaliar o desempenho, segurança e eficácia. O estudo de estabilidade fornece informações sobre o comportamento do produto submetidos a condições ambientais, desde sua fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004).

Um dos testes de estabilidade é o chamado teste de estabilidade acelerado, que nos dá dados sobre a estabilidade do produto, tempo de vida útil e a compatibilidade da formulação com o material (ISAAC et al., 2008). Algumas características do produto a ser estudado devem ser consideradas, como avaliação organoléptica, a qual determina os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor, e, a avaliação físico-química, que permite buscar alterações na estrutura da formulação que não são perceptíveis (BRASIL, 2004).

Juntamente com o desenvolvimento, avaliação sensorial e estudos de estabilidade, é empregada a técnica da reologia, a fim de desenvolver um produto final aceitável ao consumidor (LUKIC et al., 2013). A reologia estuda a deformação e o fluxo dos materiais submetidos a tensões, sob determinadas condições ao longo de um intervalo de tempo. Os dados reológicos são de grande importância para a caracterização de um cosmético em desenvolvimento (SILVA et al., 2013).

Além do estudo da estabilidade e da reologia, é necessária comprovar a eficácia pela quantificação das substâncias ativas (MAIA, 2002). Diferentes técnicas podem ser utilizadas como ensaios por via úmida, espectrofotometria no Ultravioleta (UV)-Visível ou Infravermelho (IV), cromatografia (camada delgada, gasosa, líquida de alta eficiência), eletroforese capilar entre outras (BRASIL, 2004).

Zenki e colaboradores (2004) realizaram um estudo de determinação repetitiva de AA usando um sistema de Fe^{3+} -1,10-fenantrolina-peroxidissulfato em um método de injeção de fluxo circulatório. Já Bi e colaboradores (2016) desenvolveram a quantificação de AA por sensor de microfluido colorimétrico por UV. Um método de rápida quantificação por método espectrofotometria foi desenvolvido por Ruiz e seus colaboradores (2016). Arya (2000) citou métodos de titulação, eletroquímicos, quimioluminescentes, cinéticos, fluorimetria e cromatográficos para a determinação do AA.

No entanto, a maioria dos artigos atuais utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como método de quantificação de princípios ativos, pois é considerado um método sensível e seletivo, além de ser adequado para a avaliação da estabilidade em formulações nas indústrias farmacêuticas e cosméticas (MITIC et al., 2011).

Mitić e colaboradores (2011) desenvolveram um método utilizando a coluna Superspher RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 10 μ m) a 20°C. A fase móvel foi composta por metanol/fosfato com tetrabutilamônio (30:70, v/v) em coluna C8 e ácido metafosfórico em solução aquosa com ácido metafosfórico/metanol (90:10 e 95:5, v/v) e ácido metafosfóricos/metanol/acetonitrila (90:5:5, v/v/v) em coluna C18, fluxo de 0,7 ml.min⁻¹ com uma detecção a 280nm.

Robitaille & Hoffer (2016) desenvolveram um estudo comparando o método de CLAE com detecção UV e detecção eletroquímica. Para a CLAE com detecção eletroquímica foi utilizado um detector eletroquímico Coulochem III e célula analítica 5011A. O eletrodo 1 a -175mV e detecção a 500nA e o eletrodo 2 a 550mV e detecção a 50 μ A. A coluna da CLAE foi fase reversa Phenomenex Luna (4,6 x 250mm, 5 μ m) a 25°C. A fase móvel foi metanol:água (1:4) contendo fosfato monobásico sódico, acetato de sódio trihidratado, cloreto de dodecilmetilamônio e brometo de tetraoctilfosfórico com fluxo de 0,8ml/min. Já a CLAE-UV foi usada uma coluna reversa Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150mm, 3,5 μ m) a 25°C. A fase móvel foi 1,8mmol/l de ácido sulfúrico com fluxo de 0,8ml/min.

Chen e colaboradores (2015) utilizaram o método com uma coluna YMC-Triart C18 (250mm x 4,6mm, 5 μ m) usando como fase móvel solução de fosfato monopotássico e metanol com fluxo de 1,0ml/min a 25°C. A detecção foi a 250nm.

Mostra-se uma tendência de métodos de análises que necessitam de uma rápida e fácil preparação dos reagentes, sem perder seus parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez durante a análise. Como uma alternativa aos métodos existentes, o estudo foi realizado com o objetivo de aplicar o método do CLAE-UV, que é considerado um método específico, sensível e de baixa produção de resíduos tóxicos, para a determinação do teor dos princípios ativos.

2. Objetivos

A proposta do trabalho foi avaliar a estabilidade e a eficácia de uma emulsão contendo ácido ascórbico e nicotinamida.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de emulsão
- Avaliação da atividade inibidora da tirosinase
- Estudo de estabilidade acelerada das formulações propostas contendo ou não princípios ativos
- Estudo do comportamento reológico como ferramenta para avaliação da estabilidade
- Determinação do teor dos princípios ativos nas formulações

3. Material e métodos

Material

Água destilada, tirosinase (Sigma), nicotinamida (Wersstern Drugs), ácido ascórbico (Synth), ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich), L-dopa (Sigma), hidróxido de sódio, fosfato monopotássico, Cetearyl Alcohol, Glyceril Stearate, Cetearth-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, Disodium EDTA, Pullulan, Ascorbic acid, Niacinamide, placa de 96 poços (TPP).

Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu), picnômetro 10ml (Audaz), centrífuga (Centribio), pipetadores automáticos com volume variável de 100-1000 μ L, 500-5000 μ l (Eppendorf), peagômetro digital (Gehaka PG 1800), filtro para seringa 0,45 μ m, ultrassom Ultrasonic Cleaner 2840D (Odontobras). O reômetro utilizado foi AR2000ex da TA Instrument com sensor de tipo cone-placa de 40 mm (Serial number: 993466), equipado com o software AR Instrument Control. O sistema cromatográfico utilizado foi cromatógrafo líquido PerkinElmer Flexar, com detector Flexar™ PDA Plus™ Detector e coluna cromatográfica Symmetry Shield™ RP 18 XDB, 4,6x250mm (Waters).

Métodos

3.1. Determinação da atividade inibidora da tirosinase

A avaliação da atividade inibidora de tirosinase da nicotinamida e ácido ascórbico foi realizada segundo Khzaeli e colaboradores (2009). Este método tem como princípio a inibição da atividade da tirosinase, o que implica diminuição da transformação de L-dopa em dopaquinona por reações catalisadas pela enzima. Em placas de 96 poços, foram adicionados 80 μ L da solução de nicotinamida e ácido ascórbico em diferentes concentrações (0 a 22,2

mg/mL), 45 µL de solução de L-dopa (4,5 mM) e 25 µL de solução de tirosinase (80 unidades/mL). Em todas as soluções foi utilizado tampão fosfato pH 6,8 como solvente. Após 10 minutos, os valores de absorvância foram analisados em leitor de placas a 490 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da atividade da tirosinase e são calculados segundo a equação:

$$\%inibição = \left(1 - \frac{Abs\ amostra}{Abs\ controle}\right) \times 100$$

Em que,

% Inibição = porcentagem de inibição da atividade da tirosinase;

Abs amostra = absorvância na presença de amostra em 490 nm;

Abs controle = absorvância quando a concentração de ativo é nula em 490 nm.

A partir dos valores de porcentagem de inibição foi possível obter a curva analítica e calcular a porcentagem de inibição expressa em valor de CE₅₀, quantidade de substância necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase.

3.2.Preparo das formulações

Os constituintes da formulação proposta (Tabela 1) foram pesados em balança semi-analítica e armazenados em embalagens apropriadas. As emulsões foram preparadas aquecendo todos os componentes da fase aquosa a cerca de 70-75°C e a fase oleosa a cerca de 75-80°C. Em seguida, adicionou-se uma fase à outra, lentamente, agitando vigorosamente por cerca de 5 a 10 minutos, até completa homogeneização (CORREA, 2012). O ácido ascórbico e a nicotinamida dissolvidos em água foram adicionados à formulação após o resfriamento.

Tabela 1 - Composição percentual das formulações

Componentes	Formulações		
	F1	F2	F3
Cetearyl Alcohol	8,0	8,0	8,0
Glyceryl Stearate	3,8	3,8	3,8
Ceteareth - 20	1,3	1,3	1,3
Shea Butter	0,5	0,5	0,5
Theobroma Grandiflorum	0,2	0,2	0,2
Seed Butter			

Coffee Arabica Extract	0,1	0,1	0,1
C13-15 alkane	0,25	0,25	0,25
Octyl Stearate	0,6	0,6	0,6
Dibutyl Adipate	0,6	0,6	0,6
Caprylic/capric Glycerides	0,25	0,25	0,25
BHT	0,05	0,05	0,05
Sodium Cetearyl Sulfate	1,3	1,3	1,3
Glycerin	3,0	3,0	3,0
Phenoyethanol	0,7	0,7	0,7
Disodium EDTA	0,1	0,1	0,1
Pullulan	3,0	3,0	3,0
Aqua	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100
Ascorbic Acid	1,0	-	1,0
Niacinamide	1,0	-	-

3.3.Avaliação da Estabilidade

O estudo da avaliação da estabilidade foi realizado conforme preconizado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004) e Isaac et al. (2008).

Após a manipulação das formulações, as mesmas foram submetidas a diferentes temperaturas (-5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz), durante o período de 90 dias.

Os parâmetros avaliados foram características organolépticas (aspecto, cor e odor) e físico-químicas (centrifugação, valor do pH e densidade).

3.3.1. Teste de centrifugação

Um dia (24h) após a manipulação das fórmulas, 5g de cada uma das formulações foram submetidas a rotações crescentes de 980, 1800 e 3000 rpm, em centrífuga, durante 15 minutos em cada rotação, à temperatura constante. As instabilidades podem ser observadas na forma de coalescência e separação de fases. O teste foi feito conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004).

3.3.2. Avaliação macroscópica

As formulações foram avaliadas quanto a alterações na coloração, aspecto e odor, tomando-se como referência o primeiro dia após a manipulação (24h).

3.3.3. Determinação do pH

Segundo Davis & Burbace (1977), a determinação do pH foi realizada em uma dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra em água destilada, usando peagômetro digital. Os valores de pH foram obtidos nos dias 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 45, 60 e 90, em triplicata.

3.3.4. Densidade

A densidade relativa foi determinada em picnômetro de vidro conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). As análises foram realizadas nos dias 1, 14, 45, e 90.

O valor foi calculado através da fórmula:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

Onde: d= densidade relativa

M_0 = massa do picnômetro vazio, em gramas

M_1 =massa do picnômetro com água destilada, em gramas

M_2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas

3.4. Avaliação do comportamento reológico

O comportamento reológico foi feita de acordo com a metodologia de SPAGNOL (2014). Através do reômetro AR2000ex (TA Instruments), utilizando um sensor do tipo cone-placa de 40 mm (Serial Number:993466) e os dados analisados pelo software TA Data Analysis.

O comportamento reológico foi avaliado pela determinação de:

- Propriedade de fluxo, com uma taxa de cisalhamento de 0 a 100 s⁻¹ por um período de 120 segundos para a curva ascendente e de 100 a 0 s⁻¹ para a curva descendente;
- Varredura de tensão, com tensão de cisalhamento de 0,1 a 10 Pa, com frequência de 1 Hz durante toda a análise;
- Varredura de frequência, com as amostras submetidas à tensão de cisalhamento de 1 Pa, com frequência de 0,1 a 30 Hz;
- Fluência e relaxação com tensão de cisalhamento de 1 Pa por 300 segundos e recuperação de por mais 150 segundos, sem a tensão aplicada.

Todos os ensaios foram realizados em temperatura de 32°C e os gráficos foram plotados no software Origin 7.0. As análises foram realizadas nos dias 1, 14, 45 e 90.

3.5. Determinação do teor dos princípios ativos

As concentrações de AA e NIC foram avaliadas através de método validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que foi realizada por outro integrante do nosso grupo de pesquisa. Para a análise, foi necessário pesar 0,1g da emulsão e diluído em 10 ml de água destilada e, então, filtrada. Da solução filtrada pegou-se uma alíquota de 5 ml e foi diluída novamente em 10 ml de água destilada e, em seguida filtrada em membrana de 0,22µm, obtendo uma concentração teórica de 50 µg/ml. O teor foi analisado através de CLAE adotando-se a fase móvel contendo TFA a 1% em água MilliQ, injetando 20µl, a uma vazão de 1,7 ml/min, durante 5 minutos.

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação da atividade inibidora da tirosinase

A tirosinase é conhecida por ser a principal enzima implicada no anabolismo da melanina nos melanócitos. A enzima converte a tirosina em L-DOPA e, em seguida, a oxida a dopaquinona, que desempenha um papel importante na biossíntese da melanina (BERNARD et al., 2000).

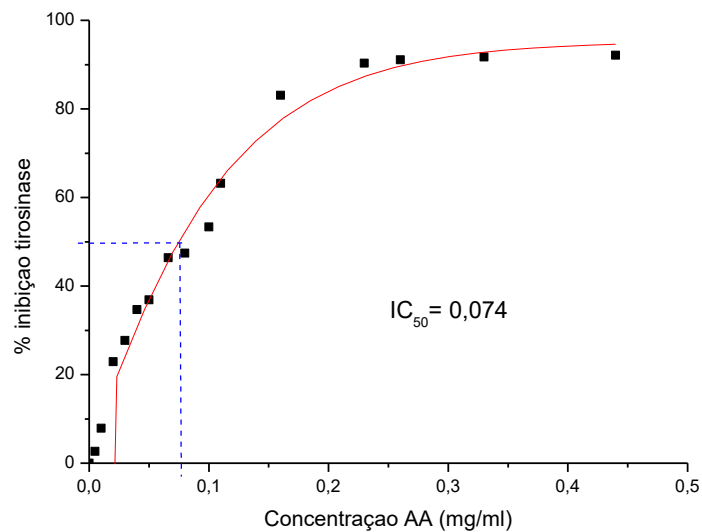
A figura 4 mostra uma placa com 96 poços com uma coloração variando de laranja escura até o desaparecimento da cor, indicando a atividade inibidora de tirosinase do ácido ascórbico.

Figura 4 - Placa de 96 poços referente à determinação da inibição da tirosinase pelo AA. Fonte: Próprio autor



A figura 5 apresenta o perfil de inibição da tirosinase pelo ácido ascórbico, indicando que para inibir 50% da tirosinase é necessária uma concentração de 0,074mg/ml de ácido ascórbico.

Figura 5 - Perfil de inibição da tirosinase pelo AA



O mesmo experimento foi realizado com a nicotinamida e não foi observada atividade inibidora da tirosinase, mesmo com o aumento da sua concentração.

4.2. Preparo das formulações

Tabela 2 - Composição percentual das fórmulações

Componentes	Formulações		
	F1	F2	F3
Cetearyl Alcohol	8,0	8,0	8,0
Glyceryl Stearate	3,8	3,8	3,8

Cetareth – 20	1,3	1,3	1,3
Shea Butter	0,5	0,5	0,5
Theobroma Grandiflorum Seed Butter	0,2	0,2	0,2
Coffee Arabica Extract	0,1	0,1	0,1
C13-15 alkane	0,25	0,25	0,25
Octyl Stearate	0,6	0,6	0,6
Dibutyl Adipate	0,6	0,6	0,6
Caprylic/capric Glycerides	0,25	0,25	0,25
BHT	0,05	0,05	0,05
Sodium Cetearyl Sulfate	1,3	1,3	1,3
Glycerin	3,0	3,0	3,0
Phenoxyethanol	0,7	0,7	0,7
Disodium EDTA	0,1	0,1	0,1
Pullulan	3,0	3,0	3,0
Aqua	q.s.p 100	q.s.p 100	q.s.p 100
Ascorbic Acid	1,0	-	1,0
Niacinamide	1,0	-	-

Os componentes graxos Cetearyl Alcohol e Gliceryl Stearate aumentaram a viscosidade, estabilizaram a emulsão e permitiram a diminuição da quantidade de tensoativo, Cetareth-20, requerido para formação de uma emulsão estável (ROWE et al., 2009).

Já os componentes shea butter (ISRAEL, 2014), Theobroma grandiflora seed butter (FLECK & NEWMAN, 2012), octyl stearate (AULMANN et al., 2000), dibutyl adipate (ANDERSEN, 2005) e caprylic/capric glycerides (DJEKIC & PRIMORAC, 2008) foram utilizados como emolientes.

O BHT foi usado como antioxidante, a glycerin como umectante e solvente, o phenoxyethanol como conservante antimicrobiano e o Disodium EDTA como agente sequestrante (ROWE et al., 2009).

Os princípios ativos Ascorbic Acid e Niacinamide foram usados como princípios ativos antioxidantes e agentes inibidores da tirosinase (HAKOZAKI et al., 2006). E foram incorporados a formulação dissolvidos em água destilada.

As formulações F1 e F2 foram utilizadas nos testes do estudo de estabilidade acelerada. Enquanto que a F3 foi preparada apenas para o estudo da determinação da quantificação de ativos, a fim de avaliar se a adição do princípio ativo NIC influenciaria ou não a estabilidade do princípio ativo AA.

4.3. Avaliação da estabilidade

A instabilidade mais comum em emulsões de óleo em água é a separação da fase devido à diferença de densidade entre as fases. Esta instabilidade física pode surgir através de vários mecanismos, tais como formação de nata, floculação ou coalescência (LATREILLE & PAQUIN, 1990).

Para contornar esta instabilidade, o estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004).

Como o aumento da viscosidade de uma emulsão só ocorre após algum tempo desde a preparação, os parâmetros a serem testados devem ser determinados após 24 a 48h depois de manipulados (ZANON, 2010).

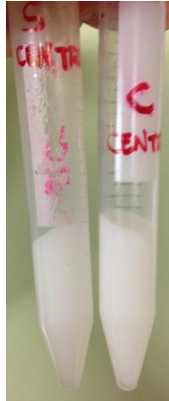
Desta forma, o tempo inicial das análises foi considerado 24h após a manipulação da formulação.

4.3.1. Teste de centrifugação

Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA, o teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases ou coalescência (BRASIL, 2004).

A Figura 6 indica que a formulação se manteve estável após ser submetida ao teste, sendo assim, o produto foi submetido aos outros testes.

Figura 6- Fotografia do teste de centrifugação da formulação sem ativos (esquerda) e com ativos (direita). Fonte: Próprio autor



4.3.2. Avaliação macroscópica

Figura 7 - Fotografias da formulação com ativos (F1) (A) e sem ativos (F2) (B) 24h após a manipulação nas condições de armazenamento -5°C , 5°C , 25°C , 45°C e exposição à luz (respectivamente). Fonte: Próprio autor



Figura 8 - Fotografia da formulação com ativos (F1) (A) e sem ativos (F2) (B) no 90º dia de análise nas condições de armazenamento -5°C , 5°C , 25°C , 45°C e exposição à luz (respectivamente). Fonte: Próprio autor



Durante os dias 1, 4, 7, 10, 14 de análise foram feitas a análise macroscópica das formulações. As propriedades organolépticas consideradas foram aspecto, odor e cor. As formulações sem a adição de ativos se mantiveram inalteradas e em todas as condições de armazenamento, não havendo alteração com relação à cor e separação de fases. (Figura 7b e

8b). Com relação à formulação com ativos, a única formulação que se manteve inalterada foi a armazenada a -5°C . No entanto, as formulações armazenadas a 5°C , 25°C , 45°C e expostas à luz, apresentaram alteração na coloração durante os dias de análise (Figura 7a e 8a). A formulação com ativos submetida à 45°C apresentou separação de fases. Não houve alteração no odor, em todas as condições de armazenamento.

4.3.3. Determinação do pH

Ao longo dos dias de análise e em todas as condições (-5°C , 5°C , 25°C , 45°C e exposição à luz), os valores de pH das formulações com ativos (F1) apresentaram pequenas variações, conforme as Figuras 9 e 10, no entanto não foram significativas.

Em comparação com as formulações sem ativos (F2), seus valores foram menores, pois os ativos adicionados apresentam caráter ácido.

Figura 9 - Valores de pH da fórmula com ativos (F1) a condições de estresse durante 90 dias de análise.

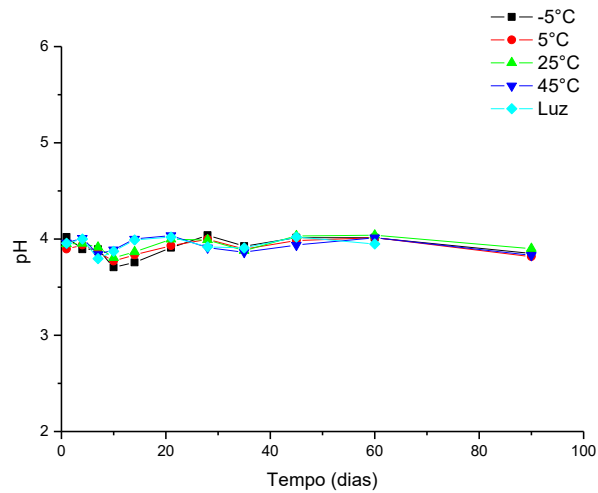
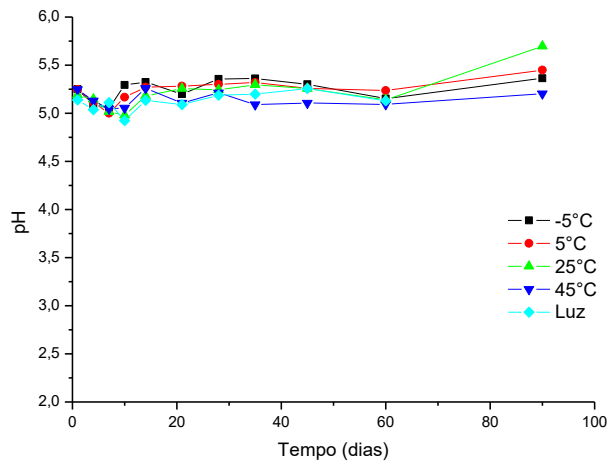


Figura 10 – Valores de pH da fórmula com ativos (F1) a condições de estresse durante 90 dias de análise.



4.3.4. Densidade

A densidade das formulações com ativos (F1) e sem ativos (f2) não apresentaram variações na densidade conforme as Figuras 11 e 12. Para a realização das análises, foram considerados 90 dias e as condições -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz.

Figura 11 - Densidade da fórmula com ativos (F1) mantida em diferentes condições durante 90 dias de análise.

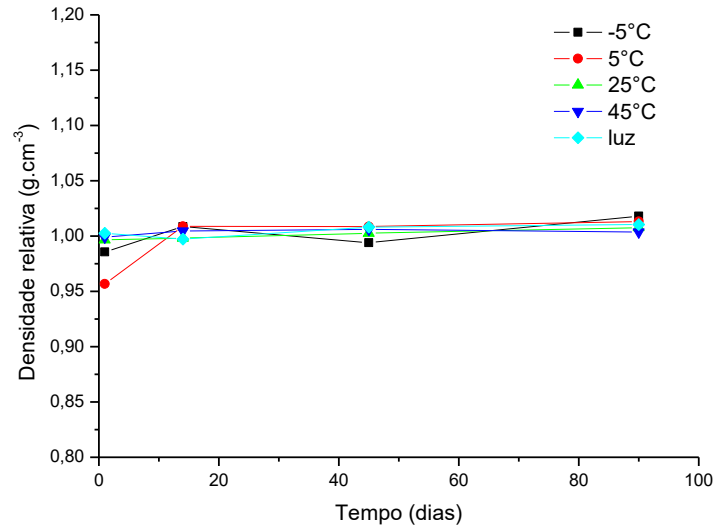
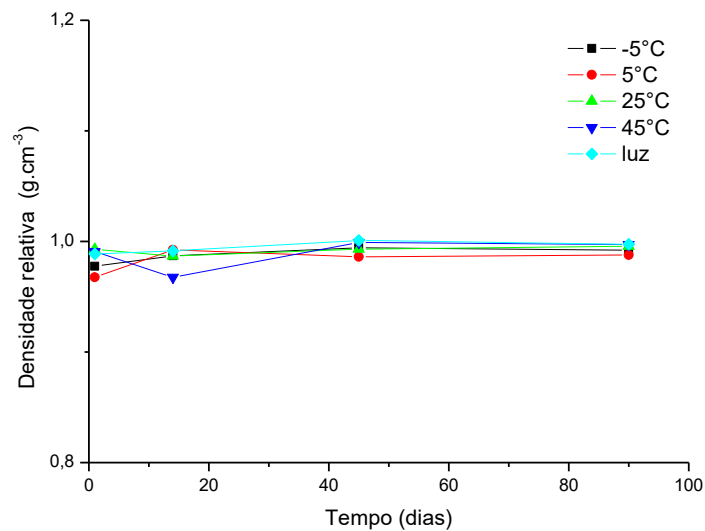


Figura 12 - Densidade da fórmula sem ativos (F2) mantida em diferentes condições durante 90 dias de análise.



4.4. Avaliação do comportamento reológico

A reologia descreve a deformação de um corpo sob a influência de tensões. O método é aplicável na caracterização de sistemas semi-sólidos, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo, grau de organização do sistema e interações entre seus componentes, podendo-se verificar sinais de instabilidade do sistema expressas como função do tempo, da temperatura e da variação na área de histerese. Outras aplicações do estudo reológico

encontram-se no controle de qualidade, na análise sensorial e em testes de tempo de prateleira (SCHRAMM, 2006; JÍMENEZ et al., 2001).

Estudos reológicos geralmente envolvem relações entre taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento. Quando a relação é linear, o fluido é chamado de newtoniano e sua viscosidade é constante, independentemente da taxa ou tensão aplicadas. Entretanto, em muitos casos, essa relação é não-linear e o fluido é classificado como não-newtoniano. Estes fluidos podem ser pseudoplásticos, os quais apresentam diminuição da viscosidade conforme aumenta a taxa de cisalhamento aplicada (SCHRAMM, 2006).

Figura 13 - Curva de fluxo da formulação com ativos a -5°C .

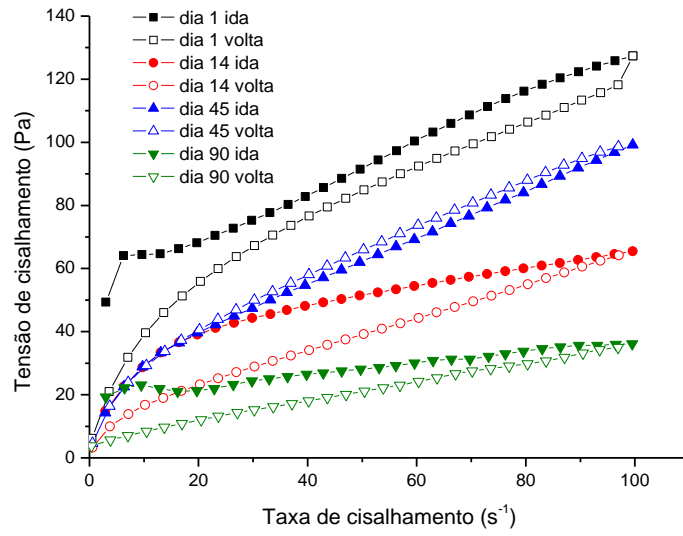


Figura 14 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a -5°C

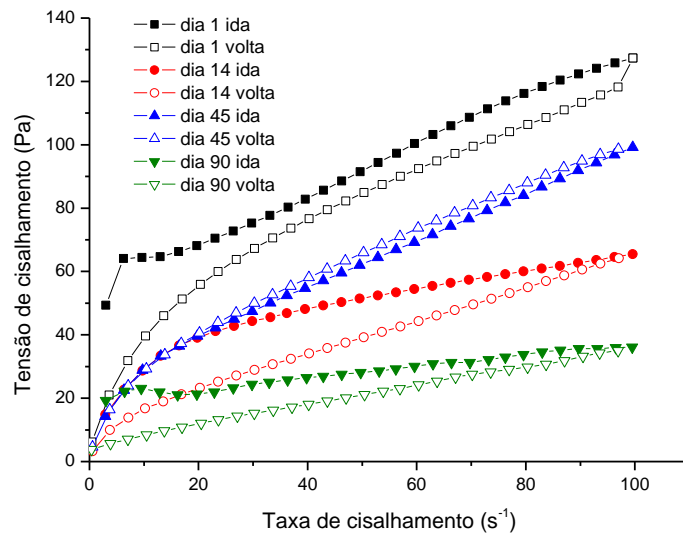


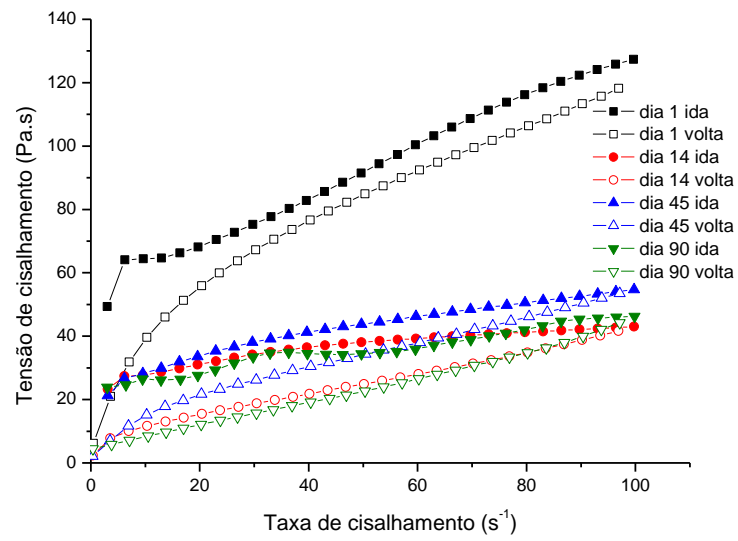
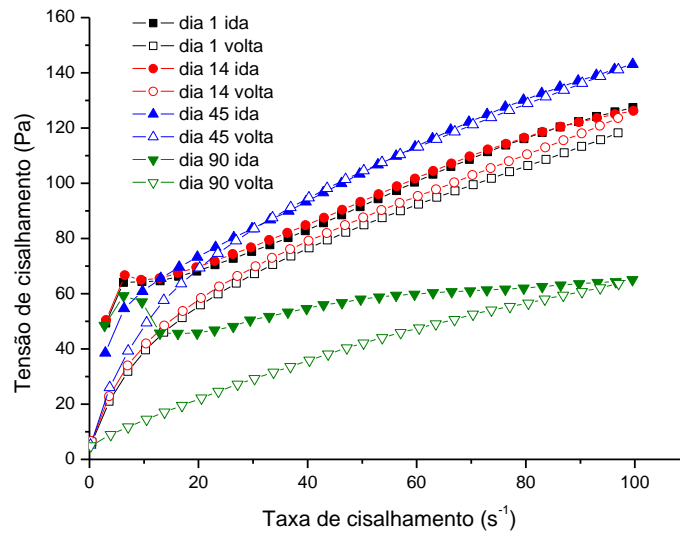
Figura 15 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 5°C**Figura 16** - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 5°C

Figura 17 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 25°C

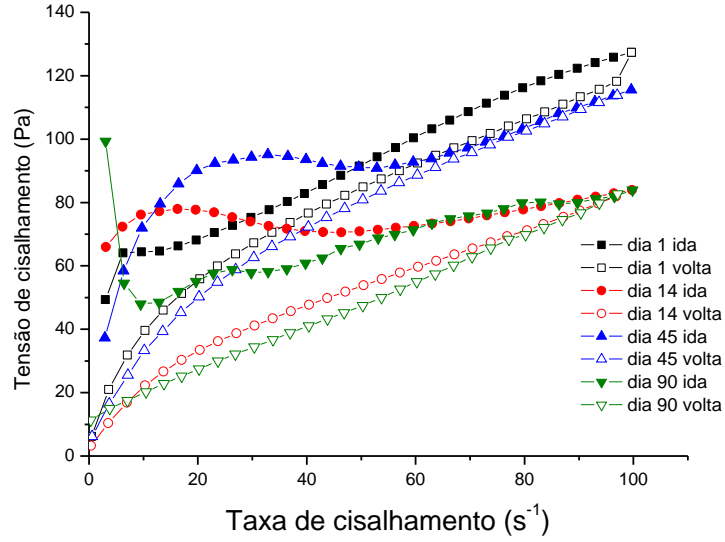


Figura 18 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 25 °C

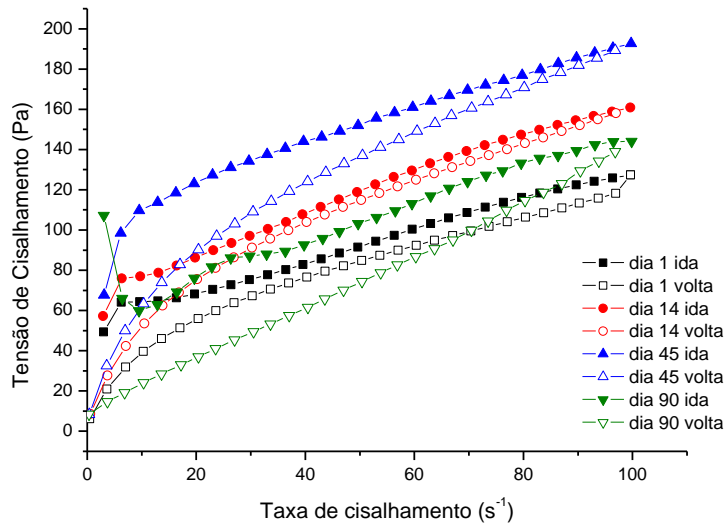


Figura 19 - Curva de fluxo da formulação com ativos a 45°C

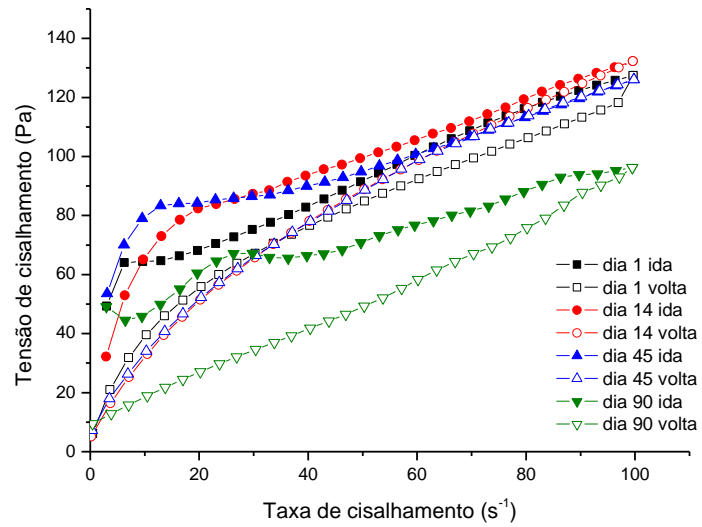


Figura 20 - Curva de fluxo da formulação sem ativos a 45°C

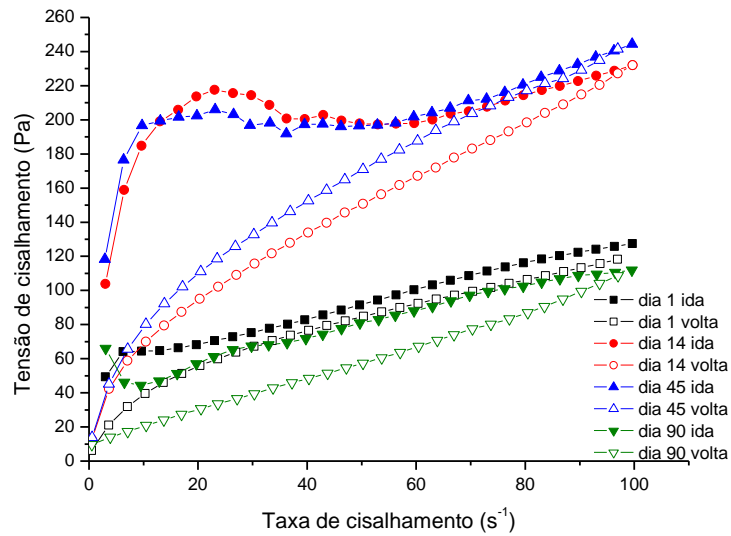


Figura 21 - Curva de fluxo da formulação com ativos exposta à luz

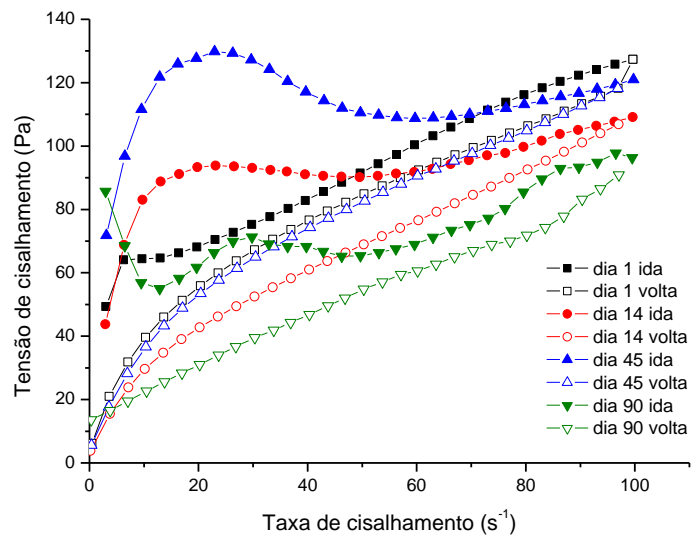
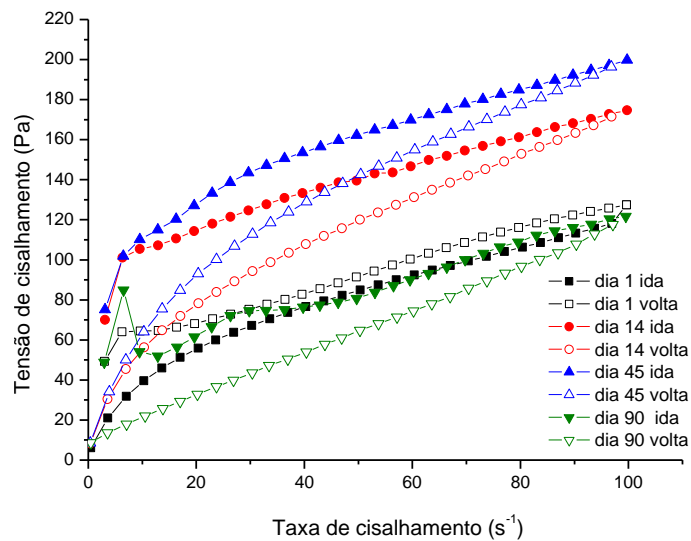


Figura 22 - Curva de fluxo da formulação sem ativos exposta à luz



Analisando as curvas de fluxo obtidas (Figuras 13 a 22), é possível observar que as formulações, tanto com ativos quanto sem ativos e em todas as condições submetidas, se comportaram de maneira não-newtoniana, uma vez que não apresentaram uma relação linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento.

A tixotropia é desejável em formulações tópicas, pois auxilia a manter estáveis os componentes em suspensão, assim como na liberação de substâncias ativas para a pele pelo desarranjo estrutural do sistema, onde a simples difusão das mesmas é facilitada (SPAGNOL, 2011).

A viscosidade pode ser considerada uma das principais propriedades reológicas de um fluido, pois indica sua facilidade de escoar continuamente sob a ação de uma tensão de cisalhamento externa (OLIVEIRA et al., 2000).

Nas tabelas 3 e 4, encontram-se os valores de viscosidade aparente mínima e área de histerese obtida a partir das análises dos reogramas durante o período de estudo das formulações.

Tabela 3 - Valores da viscosidade aparente e área de histerese da formulação com ativos submetidas a -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz

Fórmula	Tempo (dias)	Viscosidade aparente mínima (Pa.s)					Área de histerese (Dinas.cm ² .s)				
		-5°C	5°C	25°C	45°C	Luz	-5°C	5°C	25°C	45°C	Luz
F1	1	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1056	1056	1056	1056	1056
	14	0,25	0,43	0,84	1,32	1,09	514	1205	2396	1319	2674
	45	0,27	0,54	1,16	1,26	1,21	538	972	1836	1248	3718
	90	0,12	0,46	0,84	0,96	0,96	145	1254	2005	2005	2101

Tabela 4 - Valores da viscosidade aparente e área de histerese da formulação sem ativos submetidas a -5°C, 5°C, 25°C, 45°C e exposição à luz

Fórmula	Tempo (dias)	Viscosidade aparente mínima (Pa.s)					Área de histerese (Dinas/cm ² .s)				
		-5°C	5°C	25°C	45°C	Luz	-5°C	5°C	25°C	45°C	Luz
F2	1	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1393	1393	1056	1056	1393
	14	0,65	1,26	1,61	2,32	1,75	1136	1198	1175	5354	2645
	45	0,99	1,43	1,93	2,45	2	15	591	2361	4499	2634
	90	0,36	0,65	1,44	1,12	1,22	767	1742	3200	2308	2298

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que a formulação sem ativos (F2) se apresentou mais viscosa que a formulação com ativos (F1).

Figura 23 - Curva da viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a -5°C

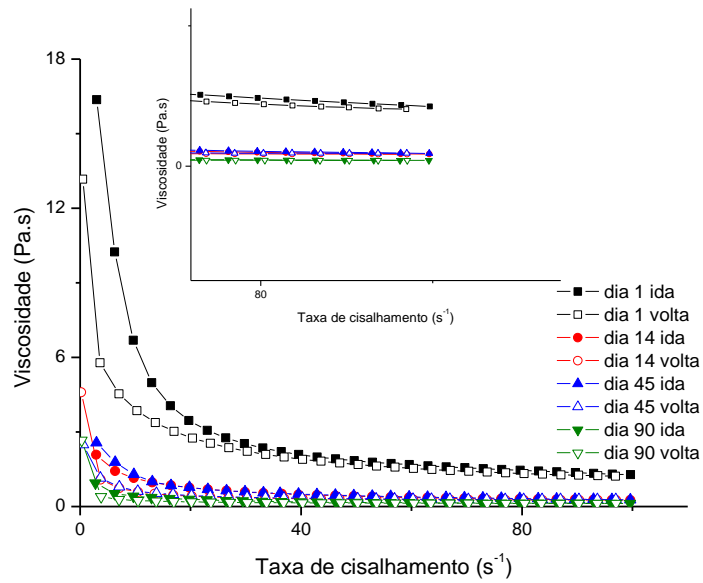


Figura 24 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a -5°C

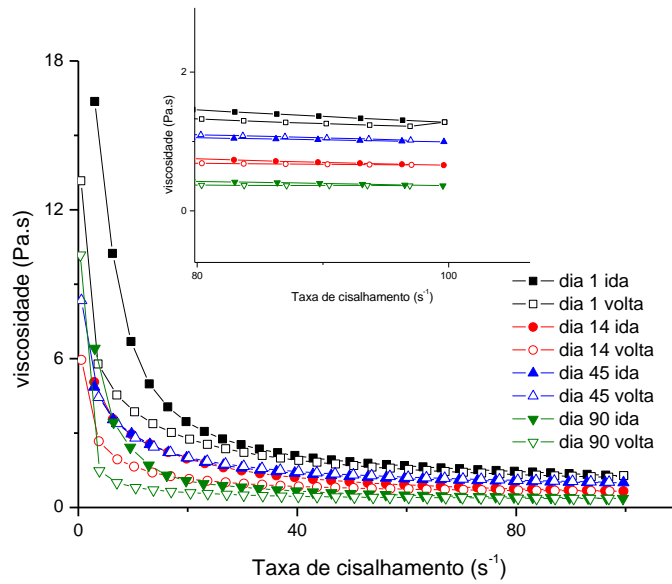


Figura 25 - Curva da viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 5°C

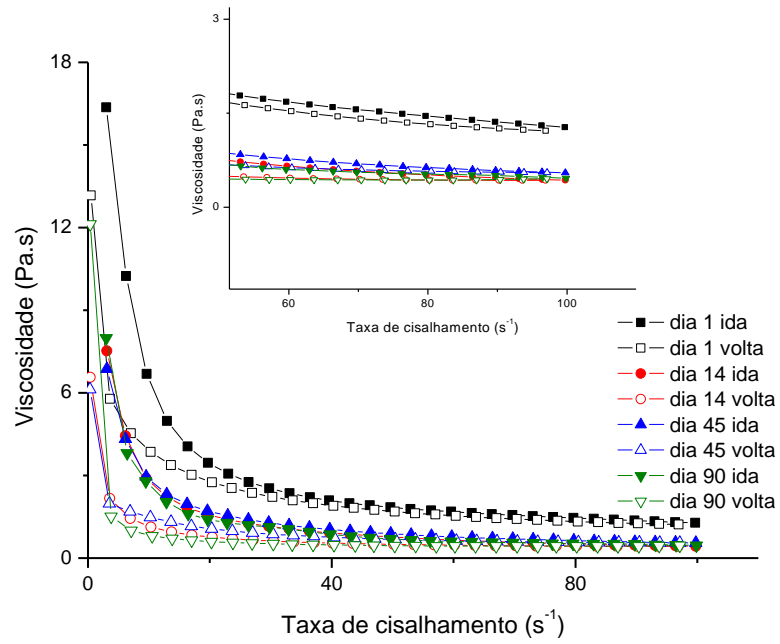


Figura 26 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a 5°C

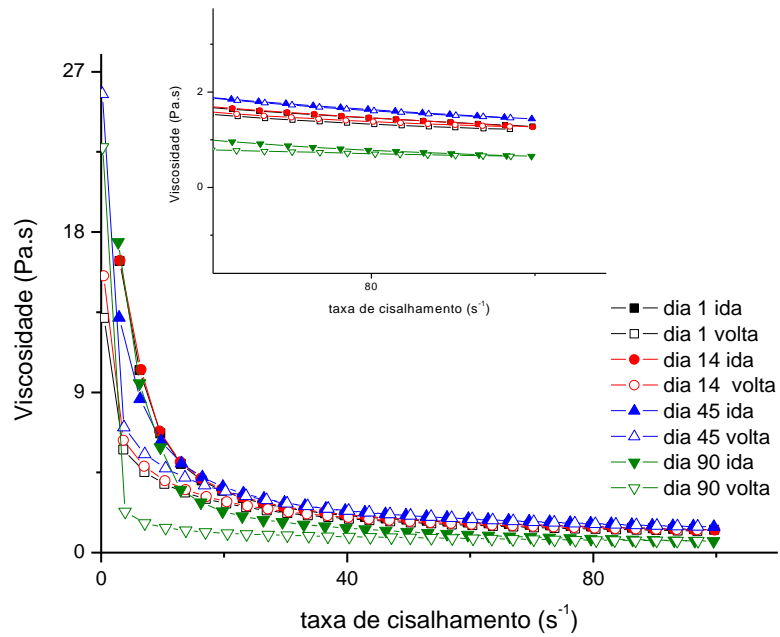


Figura 27 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos a 25°C

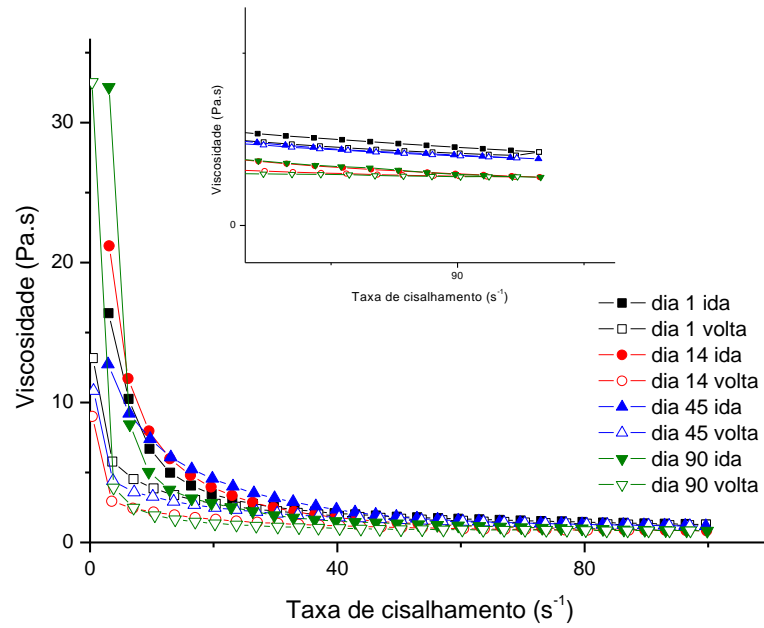


Figura 28 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos a 25°C

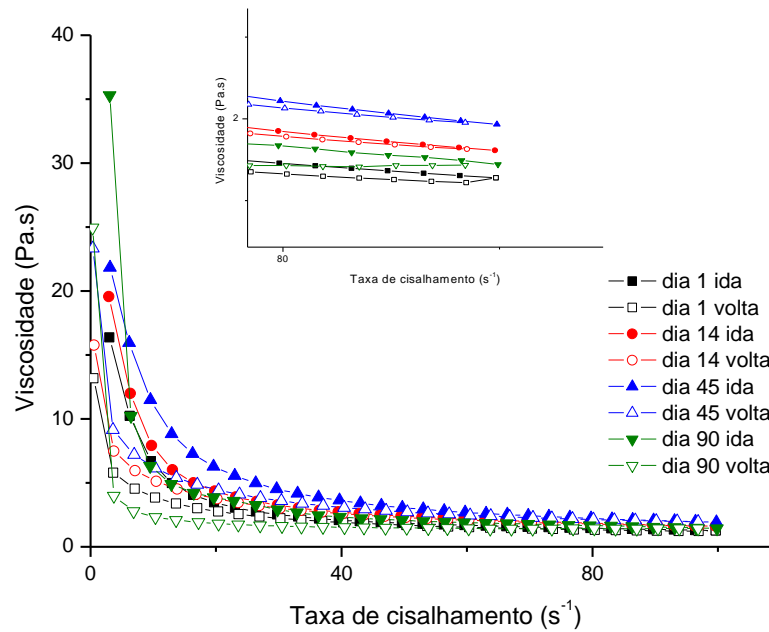


Figura 31 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação com ativos exposta à luz

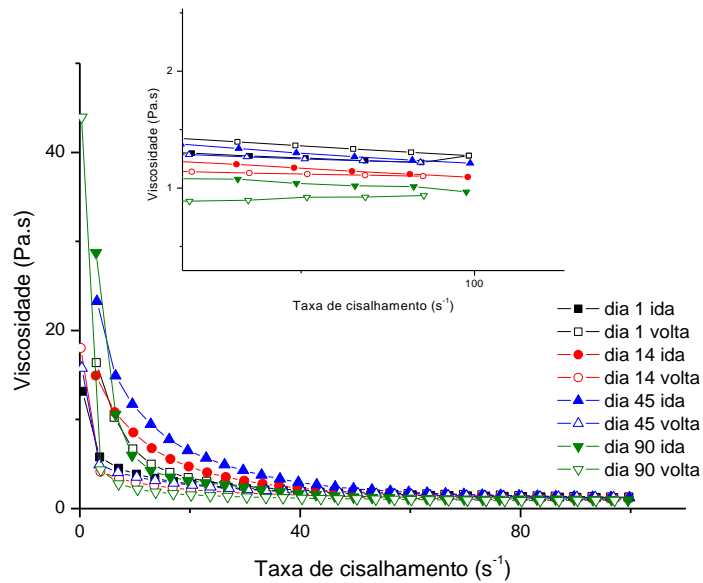
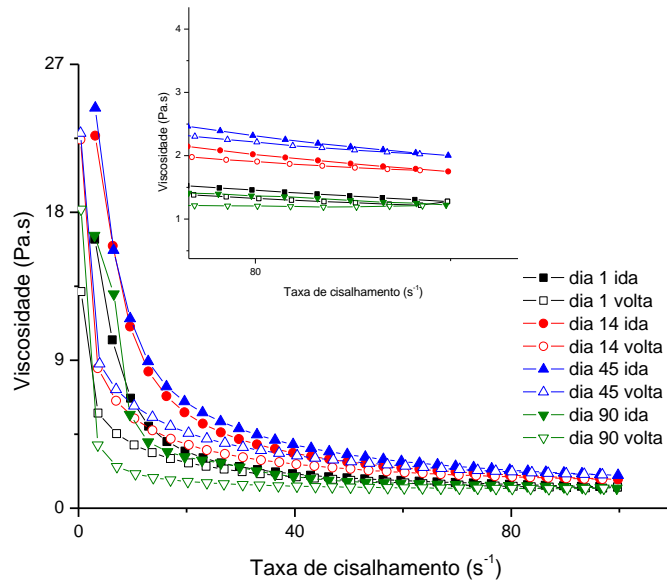


Figura 32 - Curva de viscosidade x taxa de cisalhamento da formulação sem ativos exposta à luz



Analisando os gráficos obtidos (Figuras 23 a 32), percebemos que não houve influência significativa da temperatura na viscosidade das formulações, visto que, em todas as condições analisadas, houve uma diminuição da viscosidade do 90º dia de análise em relação aos outros dias.

A análise de varredura de tensão é útil na observação da região viscoelástica linear, para a determinação de intervalos de tensão de cisalhamento em que as amostras podem ser submetidas sem nenhum dano às estruturas e, também, tensões suficientes para promover o fluxo dos produtos (SPAGNOL, 2014).

Figura 33 - Varredura de tensão das formulações a -5°C

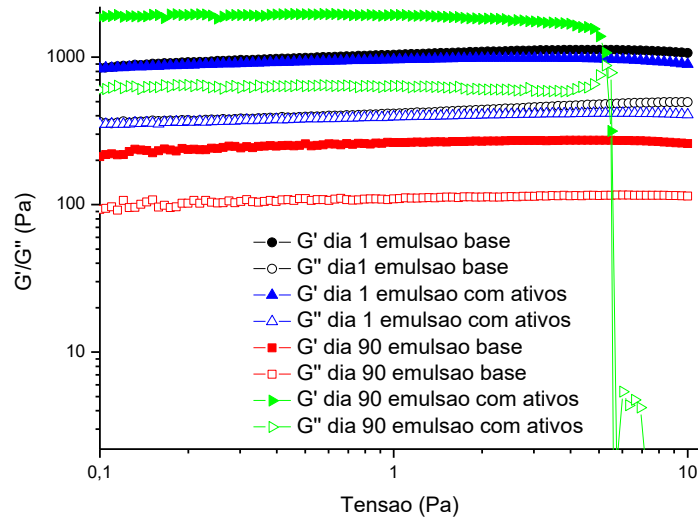


Figura 34 - Varredura de tensão das formulações a 5°C

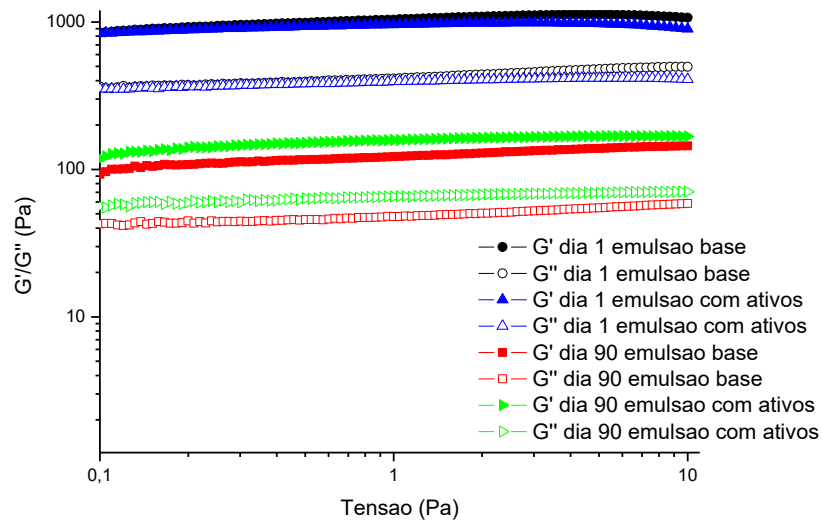


Figura 35 - Varredura de tensão das formulações a 25°C

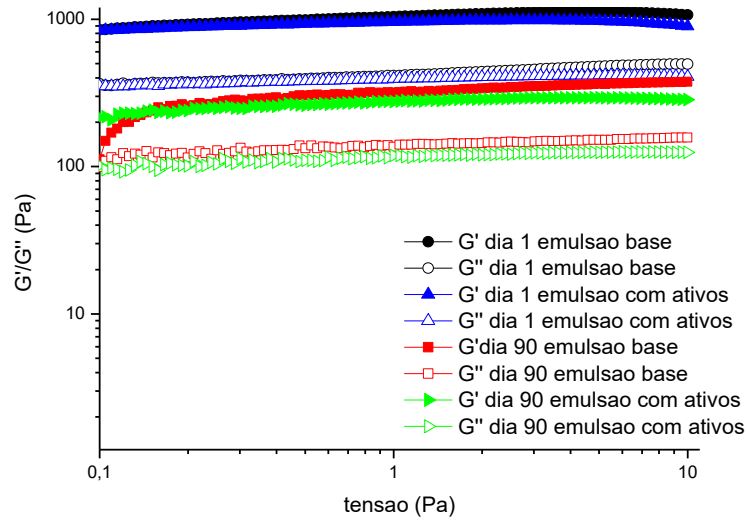


Figura 36 - Varredura de tensão das formulações a 45°C

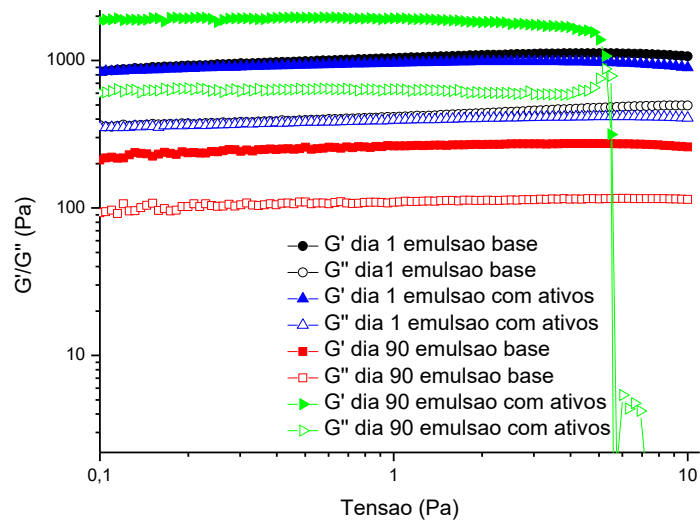
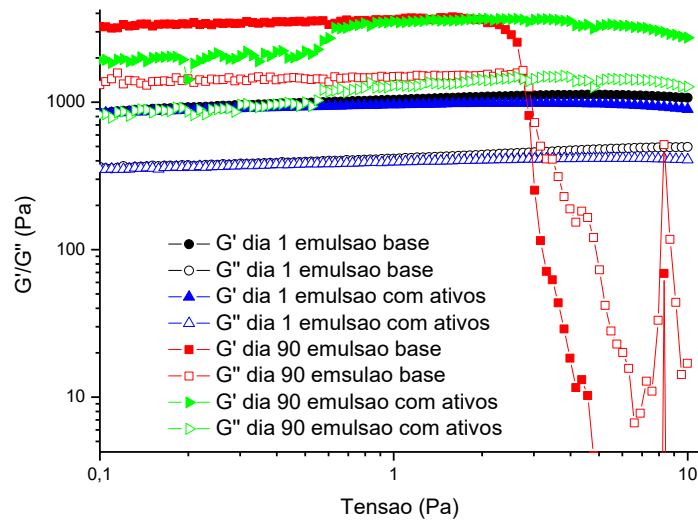


Figura 37 - Varredura de tensão das formulações expostas à luz



As figuras 33 a 37 ilustram os dados obtidos a partir das análises realizadas o primeiro e no último dia de estudo. Elas indicam que o valor de tensão de cisalhamento em que as formulações podem ser submetidas é em torno de 1 Pa, em que os parâmetros viscoelásticos G' e G'' permaneceram lineares.

A varredura de frequência é útil na caracterização de produtos com propriedades viscoelásticas (SPAGNOL, 2014).

As figuras 38 a 42 ilustram os reogramas de varredura de frequência das formulações.

Figura 38 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a -5°C

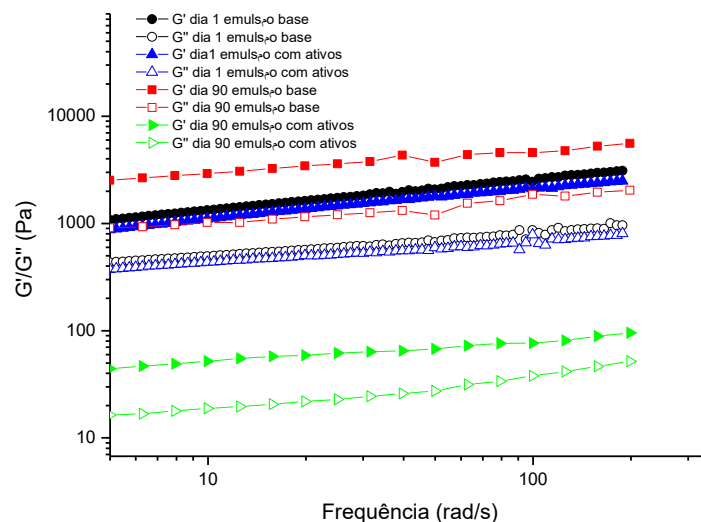


Figura 39 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 5°C

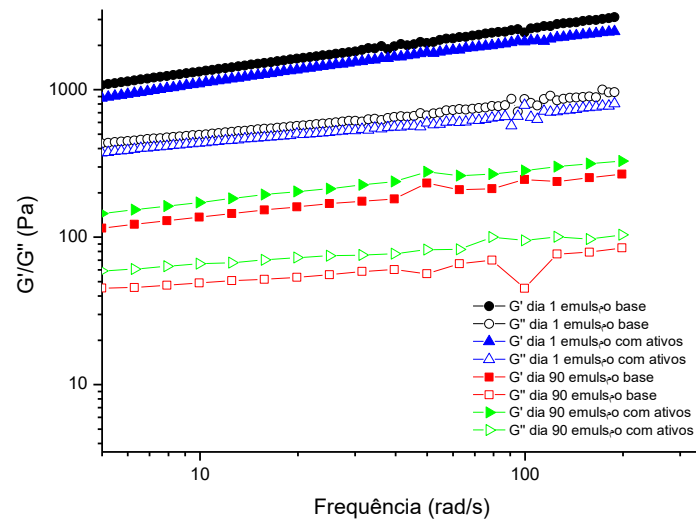


Figura 40 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 25°C

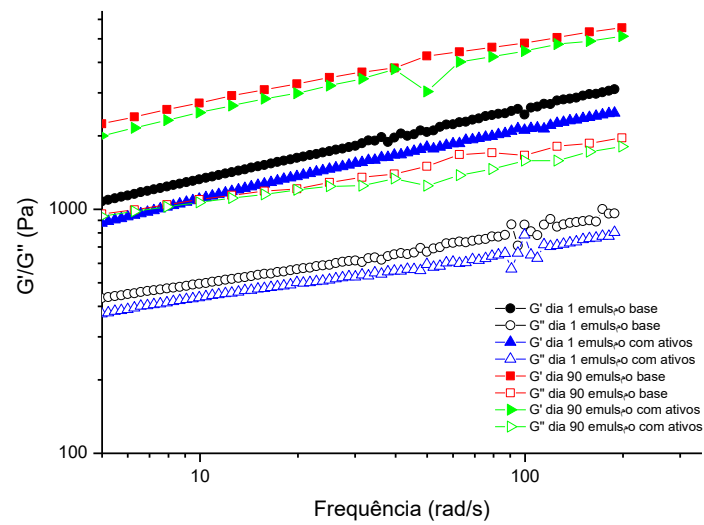


Figura 41 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações a 45°C

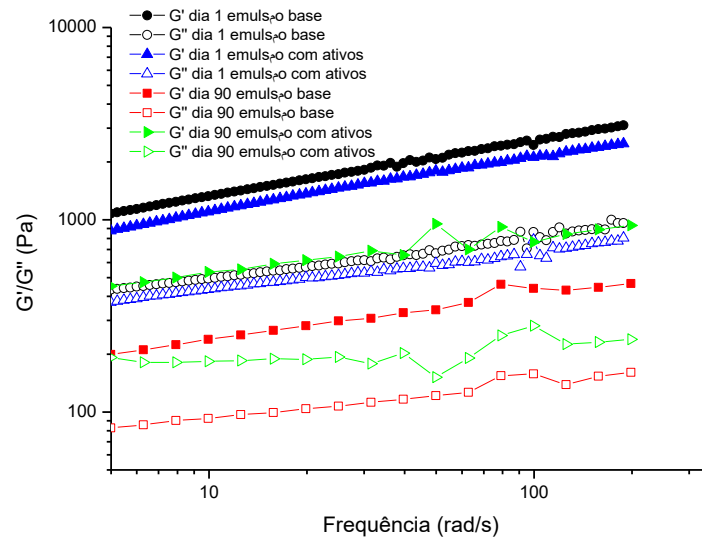
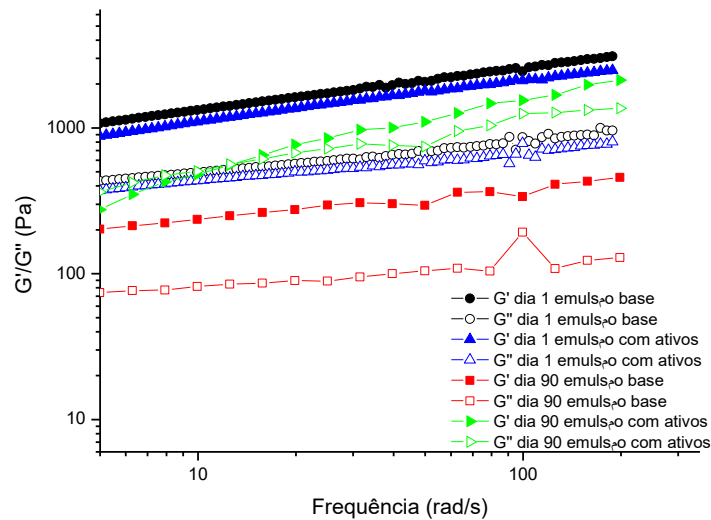


Figura 42 - Varredura de frequência nos dias 1 e 90 das formulações expostas à luz



Em todas as análises realizadas, observou-se nas figuras que o componente elástico G' é maior que o componente viscoso G'' . Esta característica vantajosa para uma emulsão, demonstrando maior estabilidade do produto (CHIARI, 2011).

O teste de fluência e relaxação é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar, de forma satisfatória, as respostas elásticas das respostas viscosas (SCHRAMM, 2006).

Figura 43 - Ensaio de fluência e relaxação das formulações com ativos nos dias 1 e 90, em todas as condições

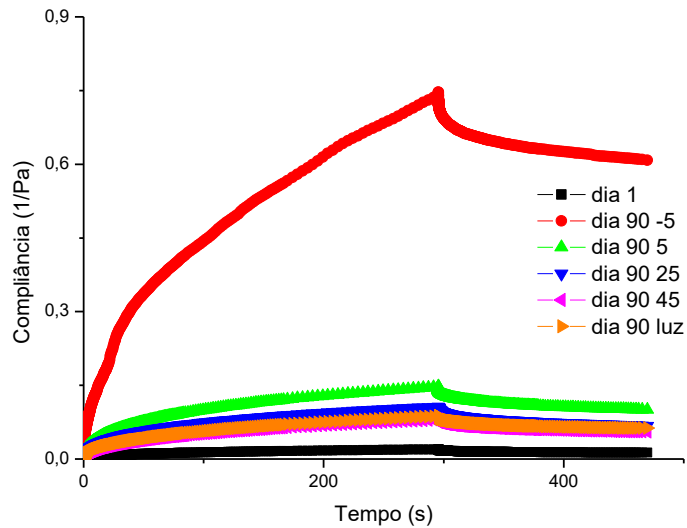
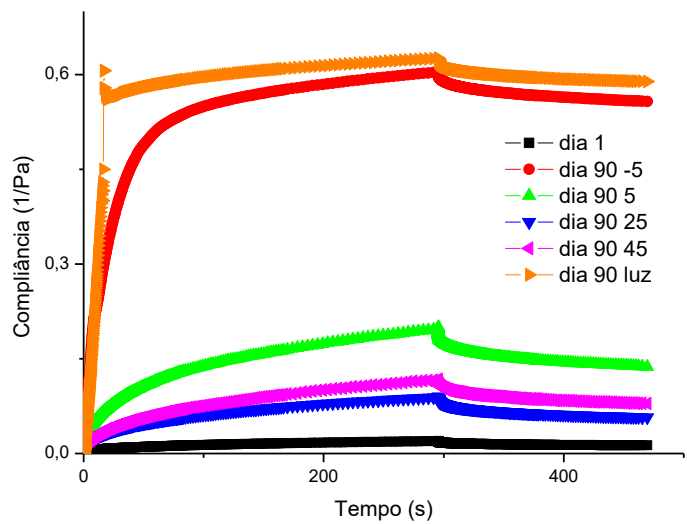


Figura 44 - Ensaio de fluência e relaxação das formulações sem ativos nos dias 1 e 90, em todas as condições

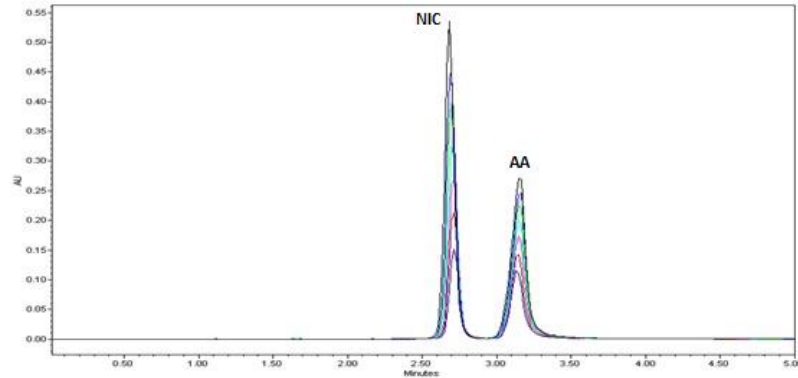


O perfil do ensaio observado nas figuras 43 e 44 demonstram que as formulações são viscoelásticas, como verificado no teste de varredura de frequência. Além disso, as formulações não foram capazes de se recuperar totalmente após cessar a tensão aplicada. Os resultados sugerem que as formulações são indicadas para o uso como produto facial, já que deve apresentar uma viscoelasticidade moderada e uma facilidade em fluir para que não escorra após a aplicação.

4.5. Determinação do teor dos princípios ativos

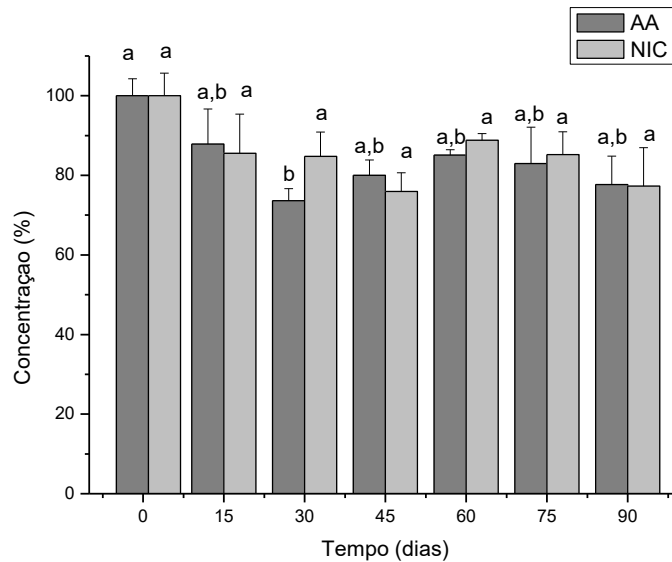
A figura 45 ilustra o cromatograma da validação do método realizada por outro integrante do nosso grupo de pesquisa.

Figura 45 – Cromatograma de NIC e AA



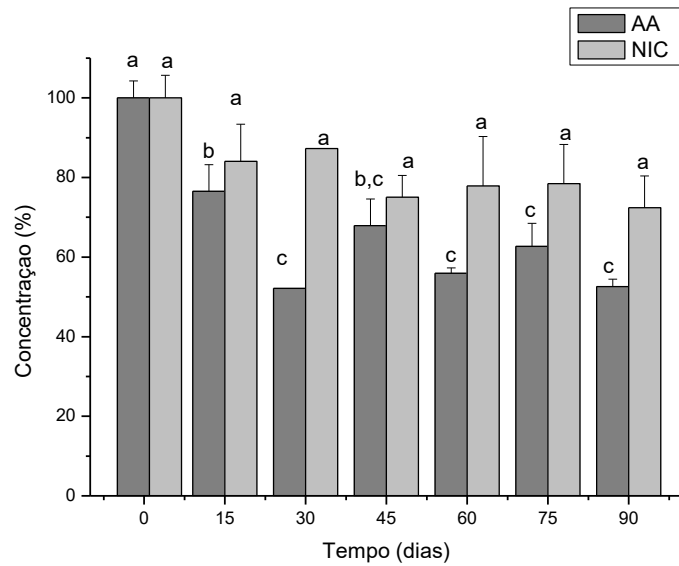
A análise do teor foi feita através do método de quantificação dos princípios ativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 46 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a -5°C



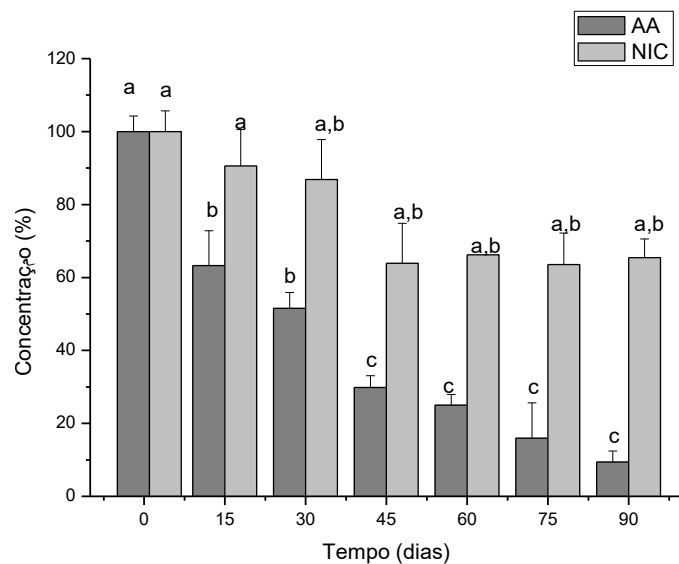
Analisando a Figura 45 é possível observar que houve uma redução do AA nos primeiros 15 dias, no entanto a concentração de NIC durante os noventa dias de análise não reduziu significativamente.

Figura 47 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 5°C



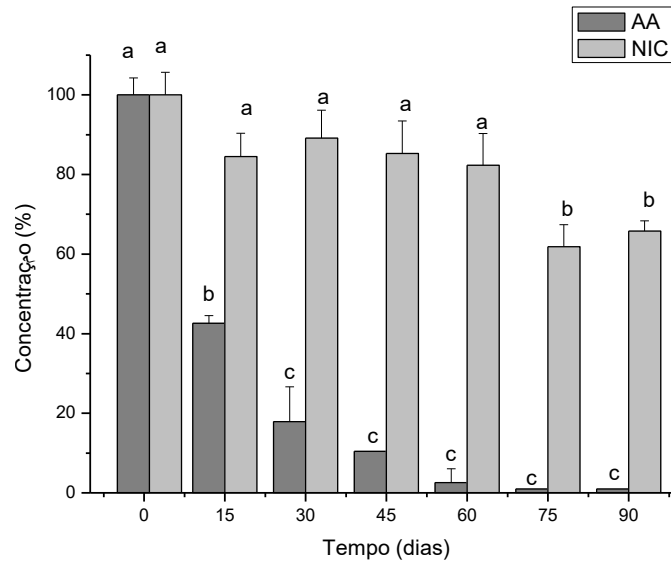
Analisando a Figura 46, durante os 15 primeiros dias de análise, pôde-se observar uma redução significativa da concentração de AA, mas a concentração de NIC ao longo dos 90 dias se manteve estável.

Figura 48 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 25°C



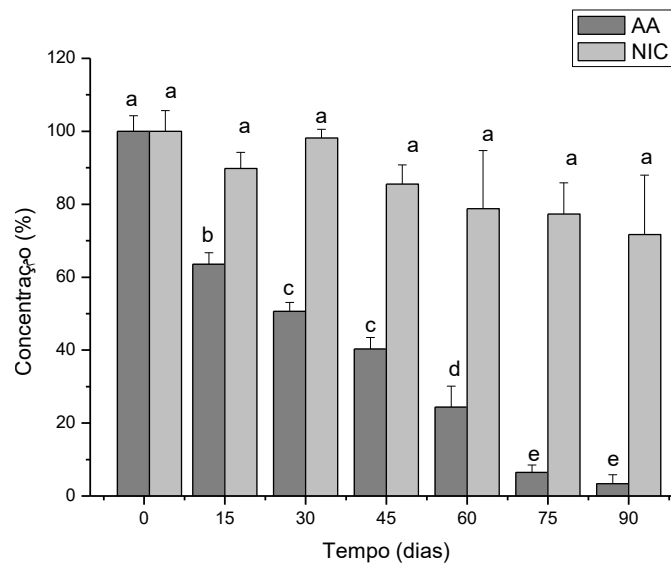
A concentração de AA durante os dias de análise reduziu significativamente, como se pode observar na Figura 47, isto se deve a sua sensibilidade a temperatura, enquanto que a concentração de NIC diminuiu nos primeiros 30 dias e se manteve estável até o 90º dia.

Figura 49 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação a 45°C



A concentração de AA diminuiu significativamente durante os 90 dias de análise (Figura 48). A diminuição se deve ao processo de oxidação que o AA sofreu por ter sido armazenada à alta temperatura, já que este processo é acelerado pelo calor (ROWE et al., 2009). Enquanto que a concentração de NIC diminuiu apenas no 75º dia.

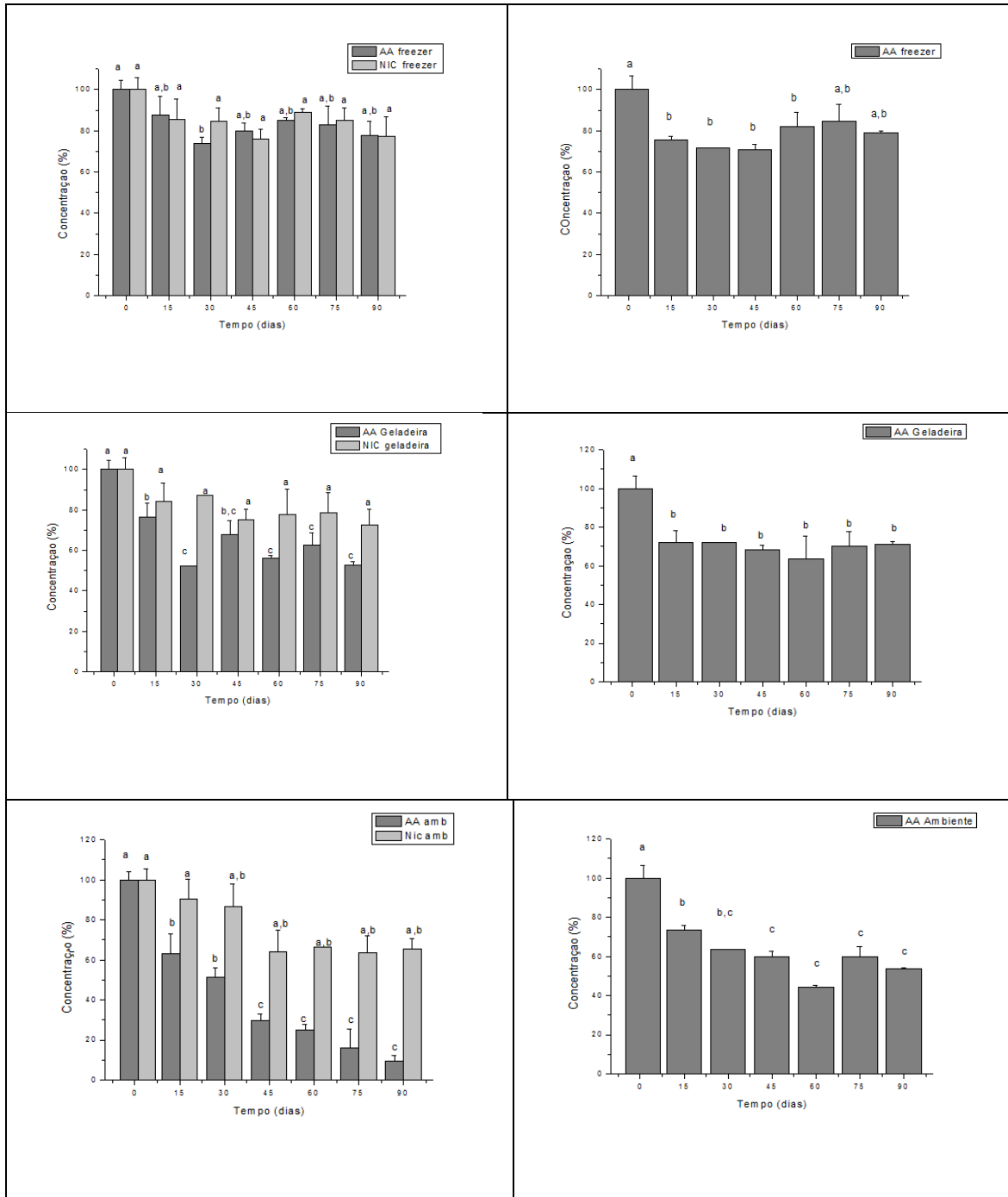
Figura 50 - Gráfico das concentrações experimentais (%) e o desvio padrão e AA e NIC da formulação exposta à luz

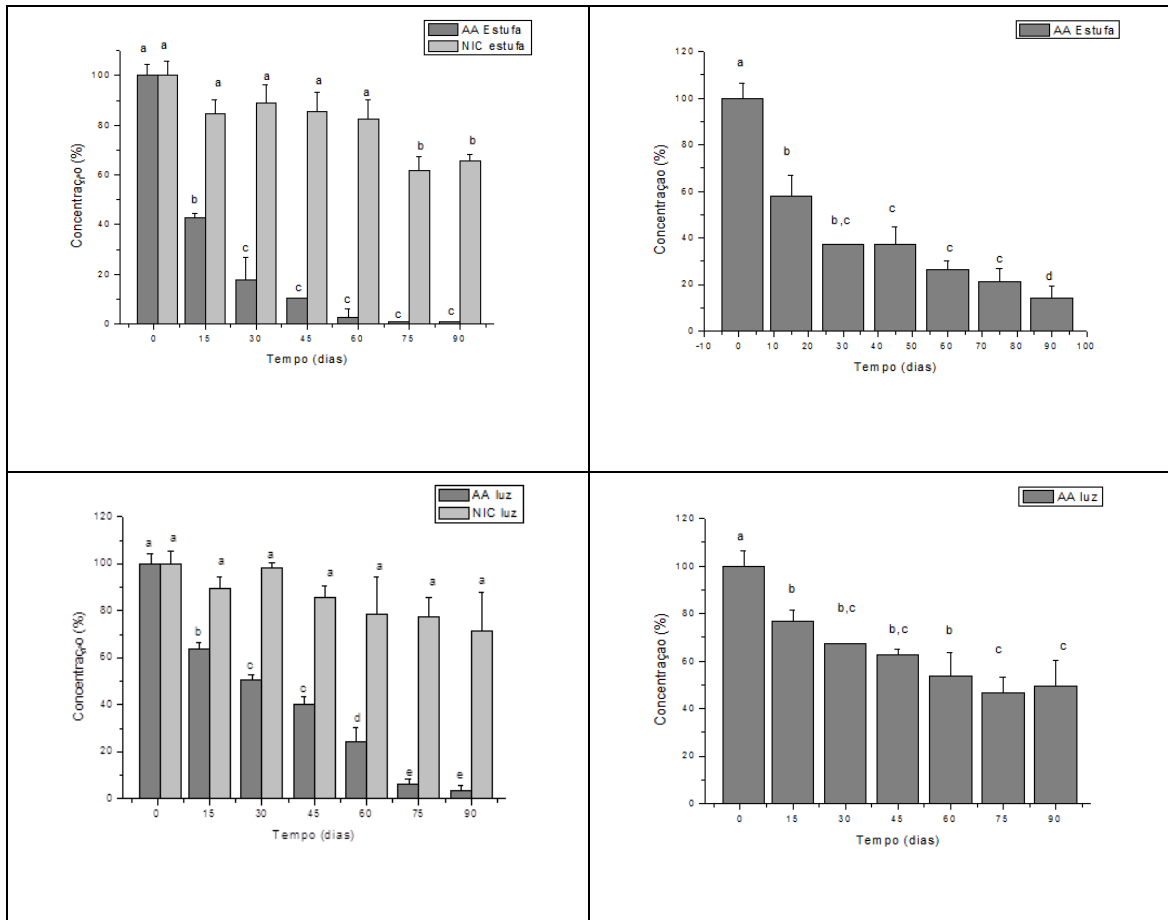


Não houve diminuição significativa na concentração da NIC nos dias de análise (Figura 49). No entanto, a concentração de AA diminuiu consideravelmente ao longo dos 90 dias, pois o AA sofreu um processo de oxidação pela luz (ROWE et al., 2009).

Os gráficos da figura 50 demonstram as concentrações do teor da formulação que contém o AA juntamente com a NIC em comparação com a formulação com AA individualmente.

Figura 51 - Gráficos comparativos das concentrações das formulações F1 e F3





Analisando as concentrações da formulação F1 (lado esquerdo da figura 50) comparando com as concentrações da formulação F3 (lado direito da figura 50) é possível observar que houve uma maior degradação do AA que se encontrava juntamente com a NIC em relação ao AA isoladamente.

A razão se deve ao fato da NIC poder ter influenciado a degradação do AA sob a radiação UV e o calor (AHMAD et al., 2011).

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o ácido ascórbico possui uma alta potência de inibição de tirosinase, sendo necessária uma pequena quantidade para a inibição da enzima. Enquanto que a nicotinamida não apresentou atividade inibitória sobre a enzima, mesmo com o aumento de sua concentração.

As formulações foram submetidas a várias condições de estresse ao longo de 90 dias de estudo da estabilidade acelerada, o que permitiu concluir que os princípios ativos não

influenciaram na estabilidade física do produto. No entanto, a sua estabilidade química foi afetada.

Tendo em vista os resultados da concentração dos princípios ativos, conclui-se que a temperatura de armazenamento do produto é um fator determinante para a estabilidade da formulação, uma vez que ao ser submetido a altas temperaturas há uma degradação dos princípios ativos e, com isso, não exerce sua função, podendo ser sugerido o seu armazenamento em embalagens opacas e locais de baixa temperatura, como a geladeira.

Para que o produto possa ser comercializado, algumas fases de experimentos ainda devem ser cumpridas, como a avaliação clínica e sensorial. Além disso, o trabalho buscou empregar metodologias que não agredissem o meio ambiente com seus resíduos.

Referências Bibliográficas

AHMAD, I.; SHERAZ, M.A.; AHMED, S.; SHAIKH, R.H.; VAID, F.H.M.; KHATTAK, S.R.; ANSARI, S.A. Photostability and Interaction of Ascorbic Acid in Cream Formulations. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.12, p.917-923, 2011.

ANDERSEN A. Amended Final Report of the Safety Assessment of Dibutyl Adipate as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**. v.25, p. 129-134, 2005.

ARYA, S.P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Nin-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. **Analytica Chimica Acta**. v.417, p.1-14, 2000.

AULMANN, W.; PITTERMANN, W.; BARTNIK, F.; STERZEL, W.; KÄSTNER, W.; POTOKAR, M. Developmental Toxicity of 2-Ethylhexyl Stearate. **Food and Chemical Toxicology**. v.38, p.57-63, 2000.

BERNARD, P.; BERTHON, J.Y. Reverastrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. **International Journal of Cosmetic Science**. v.22, p.219-226, 2000.

BI, H.; DUARTE, C.M.; BRITO, M; VILAS-BOAS, V.; CARDOSO, S.; FREITAS, P. Performance enhanced UV/vis spectroscopic microfluid sensor for ascorbic acid quantification in human blood. **Biosensors and Bioelectronics**. v.85, p.868-572, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm.

CHEN, P.; YAN, Z.; TU, X.; ZIAO, F.; LIANG, H. Determination of contents of vitamin C and its derivatives in cosmetics by high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**. v.33, p.771-776, 2015.

CHIARI, B.G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

CHOI Y.K.; RHO Y.K.; YOO, K.H.; LIM, Y.Y.; LI, K.; KIM, B.J.; SEO, S.J.; KIM, MN.; HONG, C.K; KIM, S. Effects of vitamin C vs. multivitamin on melanogenesis: comparative study in vitro and in vivo. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p.218-226, 2010.

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia: Ciência e Técnica**. São Paulo: Medfarma, 2012.

DALCIN K.B.; SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Vitamina C e seus derivados em produtos dermatológicos: Aplicações e estabilidade. **Caderno de Farmácia**, v.19, n.2, p.69-79, 2003.

DAVIS S.S.; BURBACE A.S. Electron micrography of water-in-oil-in-water emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.62, n.2, p.361-363, 1977.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M. The influence of cosurfactants and oil on the formation on pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**. v.352, p. 231-239, 2008.

FERREIRA, A.O **Guia prático da farmácia magistral**. 3ed. v.1 p. 300-301, 2008.

FLECK C.A.; NEWMAN, M. Advance Skin Care – A Novel Ingredient. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**. v.4, p. 92-94, 2012.

HAKOZAKI T.; MINWALLA, L.; ZHUANG, J.; CHOA M.; MATSUBARA, A.; MIYAMOTO, K.; GREATENS, A.; HILLEBRAND, G.G.; BISSETT, D.; BOISSY, R.E. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. **British Journal of Dermatology**, v. 147, p.20-31, 2002.

HAKOZAKI, T.; TAKIWAKI, H.; MIYAMOTO, K.; SATO, Y.; ARASE, S. Ultrasound enhanced skin-lightening effect of vitamin C and niacinamide. **Skin Research and Technology**. v.12, p. 105-113, 2006.

HASSAN, M. ASHRAF, Z.; ABBAS, Q.; RAZA, H.; SEO, S.;. Exploration of Novel Human Tyrosinase Inhibitors by Molecular Modeling, Docking and Simulation Studies. **Interdiscip Sci**, 2016.

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

ISRAEL, M.O. Effects of topical and dietary use of shea butter on animals. **American Journal of Life Sciences**. v.2, p. 303-307, 2014.

KHAZAELI, P.; GOLDOOZIAN, R.; SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.31, p.375-381, 2009.

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of Emulsion Stability by Centrifugation with Conductivity Measurements. **Journal of Food Science**. v.55, p. 1666-1672, 1990.

LUKIC, M; JAKSIC, I.; KRSTONOSIC, V.; DOKIC, L.; SAVIC, S. Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural properties of w/o emulsion. **Journal of Textures Studies**. v.44, p.34-44, 2013.

MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MITIC S. S.; KOSTIC, D.A.; NASKOVIC-DOKIC, D.C.; MITIC, M.N. Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v.10, p.105-111, 2011.

NICOLETTI M.A.; ORSINE, E.M.A.; DUARTE, A.C.N.; BUENO, G.A. Hiperpigmentações: Aspectos Gerais e Uso de Depigmentantes Cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, p. 46-51, 2002.

OLIVEIRA, I.R.; STUART, A.R.; PILEGGI, R.G.; PANDOLFELLI, V.C. **Dispersão e Empacotamento de Partículas: Princípios e Aplicações em Processamento Cerâmico**. São Paulo: Fazendo Arte, 2000.

PARVEZ S.; KANG, M.; CHUNG, H.; CHO, C.; HONG, M.; SHIN, M.; BAE, H. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. **Phytotherapy Research**. v.20, p.921-934, 2006.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

ROBITAILLE, L.; HOFFER, L. J. A simple method for plasma total vitamin C analysis suitable for routine clinical laboratory use. **Nutrition Journal**. 15:40, 2015.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6.ed. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists, 2009.

RUIZ, B.G.; ROUX, S.; COURTOIS, F.; BONAZZI, C. Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. **Food Chemistry**. v. 211, p.583-589, 2016.

ROLFE H. M. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.13, p.324-328, 2014.

SCHARAMM, G. **Reologia e Reometria**: fundamentos teóricos e práticos, 2. Ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SEGALL A. I.; MOYANO M. A. Stability of vitamin C derivatives in topical formulations containing lipoic acid, vitamins A and E. **Internacional Journal of Cosmetic Science**. v.30, p453-45, 2008.

SILVA, S.A.M.; VALARINI, M.F.C., LEONARDI, G.R. Estudo da estabilidade, análise de comportamento reológico e investigação de Cristais-Líquidos de formulações contendo pó-de-pérola. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.94, p. 109-114, 2013.

SON, K.H.; HEO, M.Y. The evaluation of depigmenting efficacy in the skin for the development of new whitening agents in Korea. **International Journal of Cosmetic Science**. v.35, p. 9-18, 2012.

SPAGNOL, C.M. **Desenvolvimento e estabilidade de formulações semi-sólidas contendo extrato de soja (*Glycine Max (L.) Merr.*)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

SPAGNOL, C.M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.

TRANG H. K. Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products. **All theses**, paper 1745, 2013.

VASHI, N. A; KUNDU, R. V. Facial hyperpigmentation: causes and treatment. **British Journal of Dermatology**. v.169, p.41-56, 2013.

ZANON, A.B. Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ZENKI, M.; TANISHITA, A.; YOKOYAMA, T. Repetitive determination of ascorbic acid using iron(III)-1,10-phenantroline-peroxodisulfate system in a circulatory flow injection method. **Talanta**. v.64, p.1273-1277, 2004.

Dados finais

Araraquara, 03 de janeiro de 2017.

Sara Hayama Arimori

De acordo,

Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa