



Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos

Isaac, V.L.B.^{1*}; Cefali L.C.¹; Chiari, B.G.¹; Oliveira, C.C.L.G.²; Salgado H.R.N.²; Corrêa, M.A.¹

¹Laboratório de Cosmetologia, LaCos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

²Laboratório de Controle Biológico de Qualidade, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 12/05/2008 - Aceito 24/07/2008

RESUMO

A crescente demanda por produtos cosméticos estáveis, seguros e eficazes tem exigido da comunidade científica estudos cada vez mais complexos e utilização de técnicas mais eficientes para determinação da estabilidade dos produtos. O uso de ativos da biodiversidade brasileira levou ao desenvolvimento de inúmeros produtos, nas mais diferentes formas cosméticas, o que dificulta, ainda mais, a padronização de protocolos experimentais para atestar a estabilidade das preparações cosméticas. Embora não exista no Brasil um protocolo que padronize os ensaios a serem realizados para se determinar a estabilidade dos produtos, vários estudos foram realizados nos meios acadêmicos para determinação da estabilidade de matérias-primas específicas. As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Além de ensaios comumente empregados, a determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, das formulações teste e dos produtos finais. A análise térmica também é usada para auxiliar o estudo da estabilidade de produtos cosméticos e, de modo geral, a calorimetria exploratória diferencial para orientar o desenvolvimento de novos produtos. Outras ferramentas, como a fluorimetria e a granulometria a laser podem auxiliar o estudo e o desenvolvimento de sistemas, emulsionados ou não. O objetivo deste estudo é o desenvolvimento de protocolo para o estudo da estabilidade físico-química de fitocosméticos - sistemas contendo ativos da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: biodiversidade brasileira; estabilidade físico-química; fitocosméticos.

INTRODUÇÃO

Fitocosmético pode ser definido como o cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal,

seja um extrato, óleo ou óleo essencial, cuja ação define a atividade do produto.

Um fitocosmético deve passar por todas as etapas de pesquisa: proposição, criação e desenvolvimento, incluindo os testes de estabilidade, para assegurar a atividade durante toda sua vida útil.

A estabilidade é um parâmetro de validação muito pouco descrita em normas de validação de metodologia analítica (Vilegas & Cardoso, 2007), mas necessária para assegurar a qualidade do fitocosmético, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade.

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto.

As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento: incompatibilidade física e incompatibilidade química, como, por exemplo, pH, reações de oxidação-redução, reações de hidrólise, interação entre ingredientes da formulação e interação entre ingredientes da formulação e o material de acondicionamento.

Técnicas de análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria podem ser usadas na compreensão de mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica e no desenvolvimento de compostos.

A espectrometria de fluorescência ou também chamada espectrofluorimetria é o método espectroscópico óptico mais extensivamente usado em meios analíticos e em investigações científicas, devido ao elevado nível de sensibilidade e ao amplo intervalo dinâmico que pode ser aplicado. Além disso, o instrumento para a maioria dos propósitos pode ser adquirido por um custo não muito elevado (Silberman, 2006).

A granulometria a laser permite determinar o tamanho da partícula por difração de laser e pode ser usada

*Autor correspondente: Vera Lucia Borges Isaac - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil. - Telefone: (16) 3301-6979 e-mail: isaacvlb@fcar.unesp.br

para análises que não destroem a amostra, seja ela seca ou úmida, com partículas de 0,02 a 2.000 micra (Kippax, 2007).

A reologia, na última década, adquiriu posição permanente nos testes de estabilidade, uma vez que as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico, interferindo na forma de utilização do produto, na adesão ao tratamento e, também, na aceitação do produto pelo consumidor.

A caracterização reológica completa de um sistema pode, então, ser útil desde o desenvolvimento do produto cosmético até a determinação do prazo de validade, incluindo influência em testes sensoriais, que auxiliam verificar a aceitação do consumidor.

Os extratos vegetais podem ser incorporados em diferentes preparações cosméticas e, dependendo da classe química de seus ativos, podem ser responsáveis pela atividade do produto. Podem ou não alterar a forma cosmética e o comportamento reológico da preparação conforme estudos realizados por Archondo (2003).

Xampus manipulados com extrato de pitanga tiveram suas viscosidades alteradas, dependendo do veículo extrator, mas não da quantidade de extrato adicionado, como atestam resultados preliminares em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

Extratos são preparações concentradas, de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtidos a partir de material vegetal ou animal, (Farmacopéia Brasileira, 2001), usando como solvente etanol, água ou mistura entre eles ou, ainda, outro líquido extrator que seja apropriado ao uso (Schulz et al., 2002). Após a extração, o solvente pode ser evaporado em evaporador rotativo e o resíduo liofilizado. Para obtenção do extrato glicólico, o mais usualmente empregado em preparações cosméticas, o material deve ser suspenso em propilenoglicol, veículo que apresenta grande compatibilidade com as formulações farmacêuticas usadas como veículos e excipientes cosméticos.

Padronizar um extrato significa estabelecer a relação ideal entre droga vegetal x extrato e a relação extrato x marcador. Muitos extratos são comercializados com o objetivo de preparar fitocosméticos sem ao menos apresentar a concentração dos princípios ativos. A utilização de extratos padronizados pode assegurar a eficácia de um fitocosmético, garantindo segurança e qualidade.

Maceração é o processo no qual o material a ser extraído é reduzido em partículas de tamanho adequado e mantido em contacto com o líquido extrator por tempo a ser determinado experimentalmente, para que a extração seja completada. Esse contacto é realizado em recipiente fechado e, ao final do processo, o extrato é separado do resíduo, o qual deve ser prensado e o líquido juntado ao extrato (Farmacopéia Brasileira, 2001).

Percolação é o processo no qual o material a ser extraído é reduzido em partículas de tamanho adequado e mantido em contacto com o líquido extrator por tempo não inferior a uma hora. Em percolador, o material deve ser coberto com o líquido extrator e após o tempo necessário à

maceração, deverá ser percolado lentamente, tendo cuidado para que sempre permaneça coberto pelo solvente. A velocidade, o tempo e a temperatura de percolação deverão ser determinados experimentalmente, para que a extração seja completada (Farmacopéia Brasileira, 2001).

Turboextração é um processo não farmacopêico que consiste em dois processos simultâneos: rasura e esgotamento do material. Isto ocorre, pois o material, ainda na sua forma íntegra, é colocado em um recipiente que possui três facas em seu fundo, que realizam um movimento rotacional, semelhante a um liquidificador, o que leva à rasura do material e permite o contato com o líquido extrator de forma cinética.

A liofilização consiste em retirar o solvente do material a ser estudado, o qual é seco por sublimação de água à pressão inferior à do ponto triplo, em misturas solidificadas ou congeladas, sem sofrer desnaturação. As características essenciais da amostra são mantidas e, a simples adição de água, é suficiente para sua reconstituição (Pombeiro, 1980).

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).

Para os testes de estabilidade, as condições de armazenagem mais comuns são: temperatura (elevada, do ambiente e baixa), exposição à luz e ciclos de congelamento e de descongelamento. A temperatura ambiente deverá ser monitorada, sendo aceita variação de até ± 2 °C e as temperaturas elevadas devem obedecer aos limites mais freqüentemente praticados, em estufas a 37, 40, 45 e 50 °C, sendo aceita variação de até ± 2 °C. Os limites de temperaturas baixas mais utilizados são em geladeira a 5 °C e em freezer de -5 a -10 °C.

Segundo o *Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances And Products* (2008), preconizado pela *European Medicines Agency*, os ensaios avaliam as amostras submetidas a diferentes temperaturas (25 °C ou 30 °C, 40 °C, 5 °C e -20 °C) em um determinado período de tempo. Para temperaturas de 25 ou 30 °C, durante o teste em longo prazo, as amostras devem ser estocadas a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C a 60% de umidade relativa $\pm 5\%$ ou a 30 °C ± 2 °C a 65% de umidade relativa $\pm 5\%$ durante 12 meses. Já no teste acelerado, as amostras deverão ser armazenadas à temperatura de 40 °C ± 2 °C a 75% de umidade relativa $\pm 5\%$ durante seis meses. Durante o teste em longo prazo no refrigerador, as amostras devem ser submetidas à temperatura de 5 °C ± 3 °C durante 12 meses, e no teste acelerado, submetidas à temperatura de 25 °C ± 2 °C a 60% de umidade relativa $\pm 5\%$ durante seis meses. As amostras também devem ser estocadas no freezer a uma temperatura de -20 °C ± 5 °C, durante 12 meses, para avaliar sua estabilidade.

A exposição do produto à radiação luminosa pode alterar a cor, levando à degradação de ingredientes da formulação. Por isso, os estudos de avaliação da estabilidade

frente à exposição luminosa, devem ocorrer frente à luz solar, captada através de vitrines especiais ou em ambientes cujas lâmpadas apresentem espectro de emissão semelhante ao do sol, como as lâmpadas de xenônio.

Os ciclos de congelamento e descongelamento alternam 24 horas em temperaturas elevadas e 24 horas em temperaturas baixas, sendo recomendados os seguintes conjuntos: ambiente e -5 ± 2 °C; 40 ± 2 °C e 4 ± 2 °C; 45 ± 2 °C e -5 ± 2 °C; 50 ± 2 °C; -5 ± 2 °C (Brasil, 2004).

Os parâmetros a serem avaliados são definidos pelo pesquisador e dependerão não só das características do produto, como também dos componentes da formulação e, principalmente, da forma cosmética. Podem ser classificados em organolépticos, físico-químicos e microbiológicos. Um cuidado a ser tomado é que os ensaios realizados devem, de fato, representar o conjunto de parâmetros que avaliem a estabilidade do produto.

A força da gravidade atua sobre os produtos fazendo com que as partículas se movam no seu interior. A centrifugação promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (Brasil, 2007). A ANVISA recomenda que, antes do início dos testes de estabilidade, o produto seja submetido à centrifugação, durante 30 minutos, a uma velocidade de 3.000 rpm com três leituras para cada amostra. A ocorrência de instabilidade é indicativa da necessidade de reformulação. As amostras consideradas, por este ensaio, inicialmente estáveis, podem ser submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar.

O objetivo desta pesquisa foi estabelecer protocolo para o estudo da estabilidade físico-química de formas cosméticas contendo ativos da biodiversidade brasileira para uso cosmético, os fitocosméticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de estabilidade propostos estão descritos de maneira geral e devem ser empregados adequadamente ao estudo da estabilidade de cada forma cosmética. Muitos foram realizados em nosso laboratório e outros foram retirados da literatura, na tentativa de mostrar sua importância na avaliação da estabilidade de fitocosméticos.

O material empregado em ensaios de estabilidade foi produzido e/ou manipulado em um único lote, usando as mesmas matérias-primas, para não haver possibilidade de interferência na estabilidade do sistema se as matérias-primas forem de diversos fornecedores e apresentarem prazos de validade diferentes. Sendo assim, para os ensaios serem realizados em triplicata, foram preparados em três lotes. Em estudos de estabilidade deve ser assegurada a quantidade de material necessária para produzir amostra suficiente para a realização de todos os ensaios.

Os fitocosméticos estudados foram identificados quantitativamente para verificação da concentração de

ativo na forma cosmética, utilizando espectrofotômetro UV/VIS, com leitura em comprimento de onda de máxima absorção ou em cromatógrafo líquido de alta eficiência. As amostras foram dissolvidas em sistema solvente adequado e submetidas à leitura para determinação da massa inicial do ativo. A comparação da concentração inicial com a concentração residual, determinada nas leituras durante todo o experimento, possibilitam a verificação da estabilidade do ativo. As formas cosméticas foram acondicionadas nas embalagens adequadas para realização do estudo da estabilidade.

Metodologia

Estabilidade Preliminar

O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada.

O teste de estabilidade preliminar tem a duração de 15 dias, sendo a primeira avaliação realizada no tempo t_1 , que corresponde a 24 após a manipulação e/ou produção, para que o produto possa adquirir viscosidade e consistência final, após sua maturação. As outras avaliações devem ser realizadas diariamente, durante toda a duração do teste. Alguns dos parâmetros a serem analisados para cada amostra, são: aspecto, cor, odor, pH, viscosidade, densidade, condutividade elétrica e devem ser apresentados como a média aritmética dos valores obtidos dos testes realizados em triplicata.

Estabilidade Acelerada

Este teste tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (Brasil, 2004). Emprega condições não extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação. É um estudo preditivo e pode ser usado para estimar o prazo de validade mas pode ser empregado, ainda, quando houver mudanças na composição ou no processo de fabricação, na embalagem primária ou para validar equipamentos e, também, no caso de fabricação terceirizada. As amostras devem ser acondicionadas em frascos de vidro neutro ou na embalagem a serem acondicionadas como produto final, o que pode antecipar a avaliação da compatibilidade entre a formulação e a embalagem. É importante que a quantidade de produto seja suficiente para as avaliações necessárias e que o volume total da embalagem não seja completado, sendo respeitado um terço da capacidade da embalagem para possíveis trocas gasosas (Brasil, 2004).

O teste de estabilidade acelerada tem duração de 90 dias, embora possa ser estendido para seis meses ou um ano, em função das características do produto a ser analisado (Brasil, 2004). As amostras devem ser

submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores, exposição à radiação luminosa e ao ambiente, com controle da temperatura e analisadas em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada.

Teste de Prateleira

A amostra, acondicionada em embalagem apropriada e mantida à temperatura ambiente deve ser analisada periodicamente, até o término do prazo de validade, em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada.

Centrifugação

Em tubo de ensaio para centrífuga, cônico, graduado, de 10 g de capacidade, devem ser pesados, em balança semi-analítica, cerca de 5 g da amostra a ser analisada, os quais devem ser submetidos a rotações crescentes de 980, 1800 e 3000 rpm, em centrífuga, durante quinze minutos em cada rotação, à temperatura ambiente (Idson, 1988; 1993a; 1993b; Rieger, 1996). A não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade.

Estresse Térmico

Em embalagem adequada, semelhante àquela a ser usada para a comercialização do produto cosmético, 10 g da amostra devem ser submetidos a condições extremas de temperatura, como 5 °C e 45 °C, para detecção de sinais de instabilidade a mudanças de temperaturas e sob manutenção de temperaturas baixas e elevadas por um determinado intervalo de tempo. A não ocorrência de separação de fases deve ser indicativa de estabilidade do produto ensaiado.

Ciclos de Congelamento e Descongelamento

Em embalagem adequada, semelhante àquela a ser usada para a comercialização do produto cosmético, cerca de 10g da amostra devem ser submetidos a condições extremas de temperaturas, nos chamados ciclos, sendo considerados para efeito de estudo de estabilidade preliminar, a realização de pelo menos seis ciclos.

Os ciclos de congelamento e descongelamento alternam 24 horas em temperaturas elevadas e 24 horas em temperaturas baixas, sendo recomendados os seguintes conjuntos: ambiente e -5 ± 2 °C; 40 ± 2 °C e 4 ± 2 °C; 45 ± 2 °C e -5 ± 2 °C e 50 ± 2 °C; -5 ± 2 °C.

Exposição à Radiação Luminosa

Em embalagem adequada, semelhante àquela a ser usada para a comercialização do produto cosmético, cerca de 10 g da amostra devem ser submetidos a condições

extremas de incidência luminosa direta, para detecção de sinais de instabilidade à exposição à luz (Brasil, 2004). A não ocorrência de separação de fases e a não alteração da coloração devem ser indicativas de estabilidade do produto ensaiado.

Aspecto

A amostra deve ser analisada, em relação ao padrão, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, de precipitação, de turvação, deve ser indicativa de estabilidade da amostra ensaiada.

O aspecto pode ser descrito como granulado, pó seco, pó úmido, cristalino, pasta, gel, fluido, viscoso, volátil, homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco e leitoso. A amostra pode ser descrita como normal, sem alteração; levemente separada, precipitada, turva; separada, precipitada, turva.

Cor

A colorimetria deve ser realizada pela comparação visual, sob condições de luz branca e espectrofotométrica, pela análise na região espectral do visível, da cor da amostra com a cor do padrão, armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra.

A comparação visual da cor da amostra ensaiada com a cor do padrão deve ser realizada em cerca de 5 g da amostra acondicionados em frascos iguais. A fonte de luz empregada deve ser a luz branca, natural.

Cerca de 1,5 g da amostra ensaiada diluídos em água destilada, na proporção de 1:1 (p/p) devem ser submetidos à colorimetria espectrofotométrica pela análise da varredura, na região do visível, e comparação com a varredura do padrão. Efeitos hiperacrômico e hipocrômico, referentes à intensidade da banda e efeitos batocrômico ou hipsocrômico, referentes à variação no comprimento de onda relativo à máxima absorção, são indicativos de alteração na intensidade da cor ou mesmo modificação da coloração e, portanto, podem ser indicativos de instabilidade.

A amostra pode ser classificada, em relação à cor em: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada.

Odor

O odor da amostra ensaiada deve ser comparado ao odor do padrão, diretamente através do olfato. A amostra pode ser classificada, em relação ao odor em: normal, sem alteração; levemente modificado; modificado; intensamente modificado.

pH

A determinação do pH deve ser realizada em uma dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra ensaiada

em água recém destilada, usando peagômetro digital, avaliando a diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra em estudo (Brasil, 2004). O eletrodo deve ser inserido diretamente na dispersão aquosa (Davis & Burbage, 1997; Isaac, 1998a; Farmacopéia Brasileira, 2001) e valores mantidos entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo, devem ser usados como critério de estabilidade.

Densidade

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Quando a água é utilizada como substância padrão, a densidade determinada é a densidade específica (Brasil, 2007).

A determinação da densidade específica deve ser realizada em picnômetro, acoplado com termômetro, previamente pesado vazio, para determinação da m_{pv} . A amostra deve ser inserida no picnômetro e a temperatura deve ser ajustada para 20 °C, quando, então, o picnômetro deve ser pesado, para determinação da m_{pa} . A diferença entre a massa do picnômetro com a amostra e do picnômetro vazio é a massa da amostra. A relação entre a massa da amostra e a massa da água, ambas a 20 °C, representa a densidade específica da amostra ensaiada (Farmacopéia Brasileira, 2001).

Viscosidade

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (Brasil, 2007). Pode ser determinada em viscosímetro rotativo coaxial, acoplado a banho termostatizado e a computador para uso de software específico para o equipamento, que tem como princípio a velocidade de rotação de eixos metálicos imersos no material ensaiado, e consiste na medição do torque requerido para rodar o sensor imerso na amostra.

O controle da temperatura e a escolha do sensor são fundamentais para a adequação da leitura. O sensor deve ser mergulhado diagonalmente na amostra, para evitar formação de bolhas. Cerca de 8 a 15g de amostra devem ser analisados no dispositivo de amostras e o sensor imerso possibilita, sob velocidades crescentes, a leitura das viscosidades. Podem ser traçadas curvas ascendente e descendente, correspondentes a velocidades crescentes e decrescentes, a fim de serem classificados os sistemas em Newtonianos ou não-Newtonianos, isto é, que apresentam e não viscosidades constantes sob qualquer condição.

Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade da amostra deve ser realizada a partir da leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em um sistema formado por uma

placa molde circular de vidro com orifício central, sobre uma placa suporte de vidro posicionada sobre uma escala milimetrada (Isaac, 1998a; Knorst & Borghetti, 2006).

A determinação da consistência por extensibilidade pode ser realizada como proposto por Isaac, (1998a), adaptado de Bueno et al. (1984), e oferece subsídios para discussão de espalhabilidade relacionada à caracterização reológica da amostra.

A amostra, cerca de 0,3g de produto deve ser colocada entre duas placas de vidro, com 10 X 18cm e 0,5cm de espessura, sendo uma delas disposta sobre um papel milimetrado, colado em uma placa de madeira. A adição de pesos de 250, 500, 750 e 1000g, a cada três minutos, na placa superior, promove o espalhamento do produto, que pode ser medido como extensibilidade, em centímetros.

A espalhabilidade pode ser determinada, ainda, quando cerca de 4mg de cada amostra de fotoprotetores, por exemplo, forem aplicados, no lado interno do antebraço e espalhados por um período de 10 minutos sobre a pele. Devem ser mantidas condições ambientais propícias, tais como temperatura de 23 °C e umidade relativa do ar de 60%. Os resultados, expressos em centímetros de extensão da região aplicada, devem ser analisados estatisticamente, para obtenção do perfil de espalhabilidade dos emolientes presentes na formulação e/ou da própria formulação. Este ensaio pode ser executado com 15 voluntários, sendo efetuadas quatro medições por pessoa (Isaac, 1998a; Francisco et al., 2001; Pereira et al., 2001).

Análise Térmica

A análise térmica deve ser realizada submetendo a amostra à análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG/DTG). A massa da amostra deve ser colocada em cadinho de platina para as análises de TG e DTG, e cadinho de alumínio com tampa perfurada para a análise de DSC. A razão de aquecimento deve ser determinada experimentalmente, em atmosfera de N₂, utilizando uma ampla faixa de temperatura.

Espectrofluorimetria

A espectrofluorescência pode ser empregada para detectar a presença de peróxido por meio de uma sonda que se torna fluorescente na presença de peróxidos, após incubação em meio tamponado (Pytel et al., 2005).

Granulometria a Laser

No equipamento de granulometria por difração a laser, a distribuição de tamanho da partícula é calculada comparando o ensaio de uma amostra com um modelo ótico apropriado.

Estudo do Comportamento Reológico

A determinação do comportamento reológico é realizada em reômetro acoplado em banho termostático, por meio de ensaios rotativos e oscilatórios, para caracterização reológica dos produtos estudados. Os ensaios rotativos permitem análise do fluxo da amostra, da tixotropia, da área de histerese e determinação do limite de escoamento, utilizando uma tensão de cisalhamento por um determinado período de tempo para a curva ascendente e mesmo tempo para a curva descendente, obtendo dados relativos a um ponto por segundo, sob temperatura controlada.

Os ensaios oscilatórios permitem analisar a deformação e a recuperação da amostra, a susceptibilidade mecânica, depois de aplicadas tensões de cisalhamento por um determinado período de tempo, em temperatura controlada, com o sensor adequado à consistência de cada produto analisado. A amostra deve ser exposta à força oscilatória, isto é, deve ser submetida a uma tensão de cisalhamento utilizando frequências variáveis, sendo possível analisar a viscosidade dinâmica (η), os módulos de estocagem ou armazenamento (G') e de perda ou deformação (G'') os quais possibilitam inferir sobre a deformação e a recuperação de amostras após o cisalhamento, avaliando a viscoelasticidade da amostra.

Em reômetro de oscilação, deve ser utilizado o sensor adequado à amostra (placa-placa, cone-placa ou copos com cilindros coaxiais) e tensão de cisalhamento de 0,01-0,5 Pa, por 180 segundos, sendo obtidos dados a cada dois segundos, a 25 °C. A deformação deve ser avaliada com duração de 300 segundos e tensão de 0 a 0,5 Pa e a recuperação também com 300 segundos, voltando à tensão de 0 Pa, em temperatura de 25 °C.

RESULTADOS

Estudos realizados em nosso laboratório, por integrantes cadastrados em nosso grupo de pesquisa, possibilitaram a obtenção de muitos dos resultados, em vários ensaios realizados, mostrados neste estudo.

Centrifugação

Dois sistemas emulsionados, um água em óleo (A/O) e outro óleo em água (O/A), contendo novas matérias-primas para sistemas A/O, propostos para realização de avaliação sensorial, usando nitreto de boro como modificador sensorial, por retirar a sensação graxa residual das emulsões água em óleo, foram submetidos ao ensaio preliminar de centrifugação, usando três diferentes rotações (980, 1800 e 3000 rpm), durante 15 minutos em cada rotação. Os dois sistemas permaneceram estáveis.

Estresse Térmico

Um sistema emulsionado água em óleo (A/O) contendo Polyglyceryl-2 e Dipolyhydroxystearate como agente emulsificante, elevadas concentrações de emolientes e de espessante hidrofílico, apresentou estabilidade no ensaio inicial de centrifugação. Ao ser submetido a estresse térmico em condição extrema de temperatura em freezer, a -5 °C, apresentou separação de fases e teve sua formulação modificada para ser submetido aos ensaios de estabilidade subsequentes para o desenvolvimento do trabalho.

Ciclos de Congelamento e Descongelo

Um sistema emulsionado contendo álcool cetosteárico etoxilado com 20 moles de óxido de etileno, como agente emulsificante, foi submetido a oito ciclos de congelamento e descongelamento, durante 16 dias, nas temperaturas -5 °C ± 2 °C e 45 °C ± 2 °C, mantendo-se estável em todo o ensaio.

Exposição à Radiação Luminosa

Um xampu manipulado com extrato de polpa de *Acrocomia aculeata* (lacq) Lood. ex Mart, quando submetido à radiação luminosa, por exposição à luz natural, apresentou mudança de coloração, caracterizada por escurecimento.

Aspecto

Uma pasta dentífrica manipulada com espessante hidrofílico, elevada concentração do agente abrasivo carbonato de cálcio e óleo essencial de folhas frescas de fruto cítrico, apresentou modificação de aspecto após ser submetida à temperatura de 45 °C; entretanto, a concentração do ativo, determinada em espectrofotometria na região ultravioleta, não foi alterada após o estresse térmico.

Cor

Uma solução hidroalcoólica contendo polpa de *Acrocomia aculeata* (lacq) Lood. ex Mart apresentou alteração de cor, caracterizada pelo escurecimento, quando mantida na bancada do laboratório, protegida da luz em frasco de vidro âmbar e envolto em papel alumínio. A adição de conservante antioxidante promoveu manutenção da coloração.

Odor

Amostras de fitocosméticos para maquiagem (loção tônica hidratante e base de maquiagem) que são usados pelos estudantes em testes para verificação e escolha das cores dos produtos a serem por eles preparados em aula prática, apresentaram modificação do odor, entretanto, nenhuma alteração visual foi notada nos produtos.

pH

Os valores de pH obtidos por potenciometria direta em dispersão aquosa das amostras estudadas, estão apresentados na Figura 1.

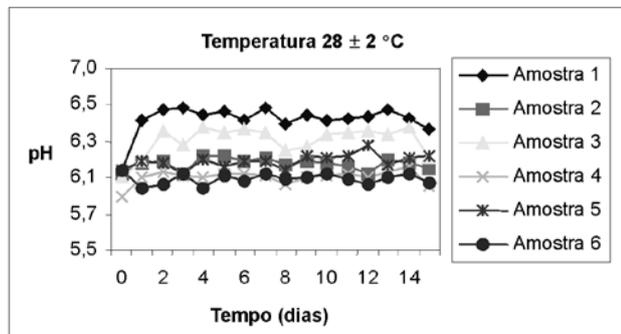


Figura 1. Valores de pH das amostras (1-6) armazenadas em temperatura de 28 ± 2 °C, durante 14 dias.

- Amostra 1 – creme padrão sem conservante
- Amostra 2 – creme padrão com conservante
- Amostra 3 – creme sem conservante + *Staphylococcus aureus*
- Amostra 4 – creme com conservante + *Staphylococcus aureus*
- Amostra 5 – creme sem conservante + *Pseudomonas aeruginosa*
- Amostra 6 – creme com conservante + *Pseudomonas aeruginosa*

Densidade

A densidade de sistemas emulsionados estudados, em duas condições de armazenamento, podem ser avaliadas nas Figuras 2 e 3.

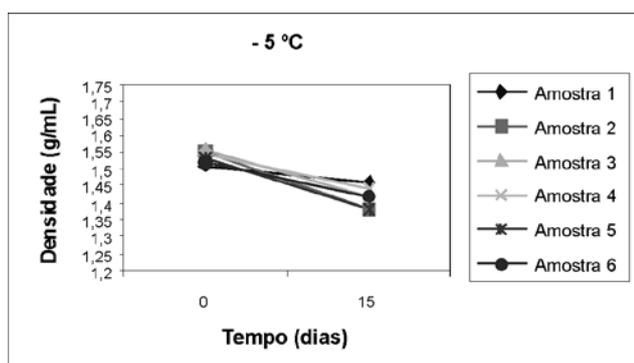


Figura 2. Valores da densidade das amostras (1-6) mantidas a -5 °C durante 15 dias.

Viscosidade

A variação da viscosidade de diferentes xampus espessados com diferentes concentrações de cloreto de sódio pode ser visualizada na Tabela 1.

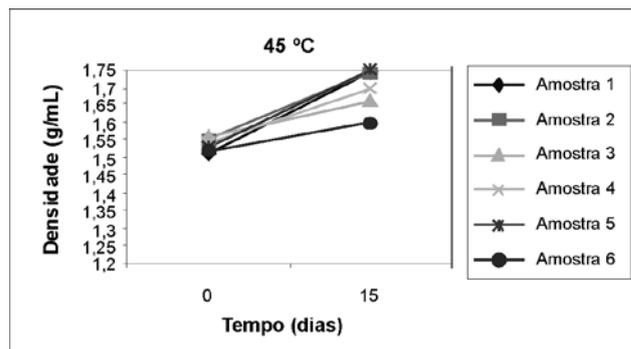


Figura 3. Valores da densidade das amostras (1-6) mantidas a 45 °C durante 15 dias.

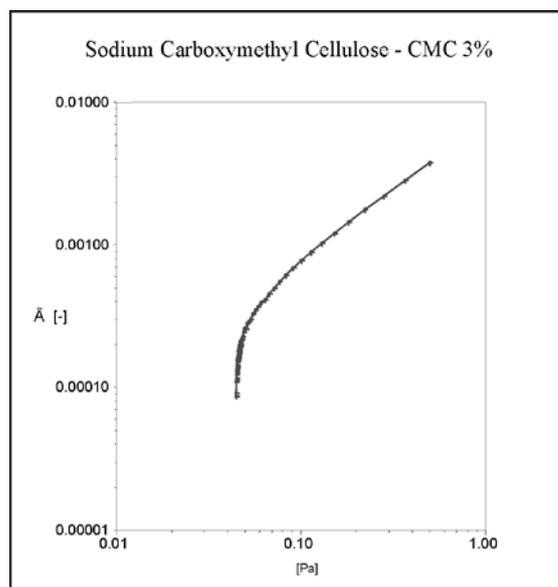


Figura 4. Reograma do gel de CMC 3% para Rampa de Tensão com limite de escoamento.

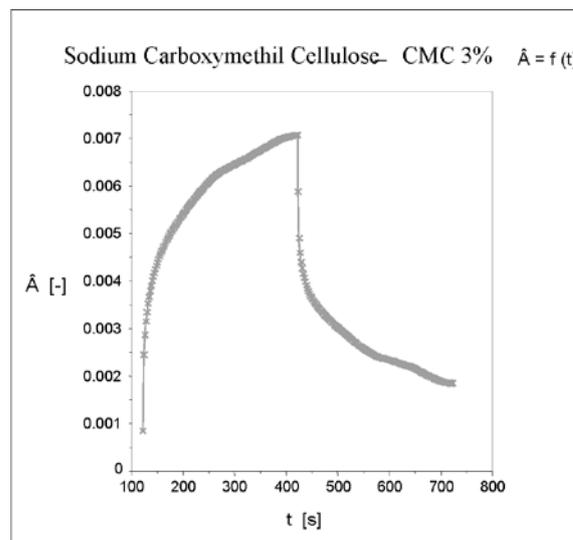


Figura 5. Reograma do gel de CMC 3% para Deformação e Recuperação.

Tabela 1 - Avaliação da viscosidade (em mPa.s), de xampus contendo diferentes concentrações de tensoativo e espessados com cloreto de sódio em dois valores diferentes de pH

	Xampu A	Xampu B	Xampu C
Concentração % do tensoativo detergente	15	25	30
Concentração % do espessante cloreto de sódio	2,8	4,0	3,2
Viscosidade, em mPa.s, em pH = 6	901,18	5047,79	11968,17
Viscosidade, em mPa.s, em pH = 7	954,42	5116,01	12512,18

Tabela 2 - Perfil de espalhabilidade em média das medidas, em cm, da região do antebraço espalhada com creme fotoprotetor com diferentes emolientes.

emoliência do fotoprotetor	média das medidas, em cm
óleo mineral	2,0133
lactato de miristila	1,6933
miristato de isopropila	1,6533
óleo de amêndoas	1,6267
manteiga de karité	1,4933
dimeticone 200	1,4333
isononanoato de cetila	1,4133

Tabela 3 - Temperatura de estabilidade e temperatura final da decomposição obtida das curvas TG/DTG dos óleos vegetais em atmosfera de nitrogênio (Faria et al., 2002)

óleo	temperatura de estabilidade °C	temperatura final de decomposição °C
araticum	320	478
babaçu	180	440
buriti	321	483
guariroba	283	433
murici	271	477

Tabela 4 - Características do tamanho das partículas observadas nas emulsões após diluição com água destilada e com solução de dodecilsulfato de sódio.

emulsão	D50 (nm)		%D < 200 nm		%D < 1 µm	
	H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS	H ₂ O	DSS
sem α - tocoferol	255 ± 1	249 ± 1	27	26	100	100
com α - tocoferol	416 ± 14	391 ± 3	13	14	71	78

Determinação da Espalhabilidade

O perfil de espalhabilidade dos emolientes presentes em sete diferentes formulações de creme fotoprotetor está apresentado na Tabela 2.

Análise Térmica

A análise térmica de óleos e gorduras vegetais, determinada por Faria et al. (2002), avaliou a temperatura de estabilidade e a temperatura final de decomposição, apresentadas na Tabela 3.

Tabela 5 - Ensaios físico-químicos a serem realizados e periodicidade de realização nos testes de estabilidade preliminar, acelerada e de longa duração.

TESTE DE ESTABILIDADE	Estabilidade	dia	tempo	CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO				radição luminosa								
				centrifugar	estresse térmico	ciclos	viscosidade									
preliminar	1	0	manipular os produtos	cor visual	cor	espectro	odor	pH	densidade	viscosidade	condutividade elétrica	espalhabilidade	análise térmica	fluorimetria granulometria	comp reológico	
	2	1	analisar aspecto	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH	odor
	3	2	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	4	3	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	5	4	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	6	5	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	7	6	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	8	7	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	9	8	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	10	9	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	11	10	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	12	11	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	13	12	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	14	13	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	15	14	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
normal	16	15	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	17	1	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	23	7	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	31	15	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	37	21	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	46	30	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	61	45	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	76	60	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	91	75	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	106	90	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	136	120	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	166	150	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	196	180	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	256	240	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	381	365	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
556	540	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH	
746	730	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH	
longa duração	17	1	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	17	1	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	23	7	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	31	15	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	37	21	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	46	30	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	61	45	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	76	60	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	91	75	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	106	90	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	136	120	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	166	150	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	196	180	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	256	240	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
	381	365	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH
556	540	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH	
746	730	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	aspecto	cor visual	odor	pH	odor	pH	

Espectrofluorimetria

A pele irradiada e tratada com creme contendo o complexo antioxidante testado apresentou concentração 116% menor de peróxidos cutâneos, enquanto a pele tratada com creme sem o complexo antioxidante apresentou concentração 49% menor (Pytel et al., 2005).

Granulometria a Laser

A média do tamanho das partículas e as porcentagens de partículas com tamanhos menores que 200 nm e menores que 1 µm estão apresentadas na Tabela 4.

D_{50} é a média dos diâmetros médios

%D < 200 nm é a porcentagem de partículas com diâmetros menores que 200 nm

%D < 1 µm é a porcentagem de partículas com diâmetros menores que 1 µm

Estudo do Comportamento Reológico

Os reogramas dos ensaios rotativo e oscilatório com gel de sodium carboxymethyl cellulose estão mostrados nas Figuras 4 e 5.

A Tabela 5 mostra o protocolo proposto para avaliar a estabilidade físico-química de fitocosméticos, com base no conjunto de ensaios utilizados.

DISCUSSÃO

O uso de ingredientes de origem natural em cosméticos ganhou popularidade e, entre eles, podem ser citados os extratos vegetais, óleos vegetais, óleos essenciais e seus derivados que, incorporados nas formulações, agregam bioatividade, funcionalidade e apelo de marketing (Priest, 2006).

Nas últimas duas décadas, a indústria cosmética tem lançado produtos contendo ingredientes naturais, mas as definições, ainda, são ambíguas ou incertas. Uma corrente define natural como a substância que vem de uma fonte vegetal renovável e que não seja derivado nem de outra forma quimicamente modificada ou alterada. Outra definição, mais ampla, considera natural a substância ou seus derivados sintéticos de origem natural, o que poderia englobar todas as matérias-primas, uma vez que podem ser reduzidas a uma origem ou outra, entre os reinos animal, mineral ou vegetal (Oliveira & Bloise, 1995).

A partir do lançamento de uma linha muito variada de produtos cosméticos por uma grande empresa brasileira do setor, que usou ativos da Biodiversidade Brasileira, a Amazônia passou a ser o centro das atenções das empresas fornecedoras de matérias-primas para a produção de cosméticos, no Brasil e no mundo. O manejo sustentável tem sido explorado pelas empresas fornecedoras de matérias-primas, mas o caboclo é um suporte indispensável

nessa cadeia, pois além de se beneficiar com a exploração, ajuda a manter a floresta em pé, uma vez que se preocupa com a derrubada das árvores, pois, do contrário, na próxima colheita não teria as sementes desejadas pelos fornecedores.

Silva (2002) apresentou estudos de bioengenharia cutânea comprovando a eficácia de bioativos tropicais e, assim como esse autor, vários pesquisadores têm estudado ativos brasileiros aplicados em cosméticos. Sua conclusão mostra a importância da associação da tecnologia com a cultura popular, para estudo e conseqüente uso de ingredientes naturais em cosméticos. Isso tem aumentado a pesquisa referente ao isolamento, à identificação e à quantificação de compostos ativos das plantas e suas atividades biológicas (Teodor et al., 1998; Galhardo et al., 2007a).

No Brasil, estão localizadas cerca de 20 por cento das duzentas e cinquenta espécies medicinais catalogadas pela UNESCO, facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças (Drumond et al., 2004; Galhardo et al., 2007b).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos. Tal realidade serviu para muitas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Nascimento et al., 2007).

Pesquisas demonstraram que o óleo essencial (constituído por um conjunto de componentes) apresenta uma melhor atividade terapêutica do que as substâncias isoladas que representam sua composição principal, por exemplo: o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* tem atividade anti-séptica maior do que o seu principal constituinte ativo isolado, o cineol ou eucaliptol (representando 80% da composição). Um óleo essencial possui uma composição complexa sendo, algumas vezes, de centenas de diferentes compostos químicos, os quais apresentam ação sinérgica ou complementar entre si, aumentando sua atividade (Simões et al., 2000).

Estudos laboratoriais preliminares (Galhardo et al., 2007a, Galhardo et al., 2007b), demonstraram atividade inibidora de crescimento bacteriano frente a diferentes substâncias químicas, de óleo essencial de pitanga coletado em diferentes épocas.

A tendência mundial é a padronização de extratos através de técnicas rápidas e eficientes, sejam elas espectrofotométricas e cromatográficas, como cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com a finalidade de se determinar as substâncias normalmente presentes, responsáveis pela atividade cosmética, mesmo que em pequenas concentrações (Jácome et al., 1999).

Dois fatores básicos determinam a composição de um extrato: a qualidade do material vegetal e o processo de produção (Schulz et al., 2002). A padronização de extratos vegetais deverá ser realizada a fim de ser conhecido o teor de um ou mais constituintes (Farmacopéia Brasileira, 2001).

A padronização pode ocorrer pela diluição com o solvente usado na extração ou com extratos menos concentrados, obtidos nas mesmas condições ou, ainda, pela adição de materiais inertes ou concentração por processo sob pressão reduzida, em temperatura onde a degradação dos constituintes do extrato não seja significativa.

Alguns estudos já foram realizados por integrantes do nosso grupo de pesquisa, utilizando extratos vegetais para o desenvolvimento de fitocosméticos e suas técnicas de controle de qualidade (Silva et al., 2004, Salvagnini et al., 2006, Baby et al., 2007, Iha et al., 2008).

Um dos processos mais usados para obtenção de extratos é a turboextração, no qual muitas estruturas celulares são rompidas, permitindo contato direto do líquido com os metabólitos secundários, entre outras substâncias, possibilitando esgotamento mais rápido, necessitando apenas de 15 minutos. Um inconveniente deste processo é o calor devido ao movimento de rotação das facas, podendo levar à degradação de substâncias de interesse.

Franco & Bueno (1999), compararam os processos de turboextração (15 minutos) e maceração (42 dias) na extração de própolis, e concluíram que, para as finalidades propostas, o primeiro foi mais eficiente, além de ser um processo mais ágil que os demais.

Segundo monografia da *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*, o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. A estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto.

O estudo da estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento; fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos.

O teste de estabilidade preliminar, realizado em um curto intervalo de tempo, pode ser considerado um teste orientativo no desenvolvimento de produtos. Consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura, objetivando acelerar processos de instabilidade, para auxiliar na triagem de formulações e não ser estimativo de vida útil do produto.

A centrifugação, o estresse térmico e os ciclos de congelamento e descongelamento são ensaios realizados em condições extremas de armazenamento que podem fornecer indicações de instabilidade da formulação, mostrando a necessidade de alteração na sua composição.

Provavelmente, o escurecimento de xampus manipulados com extrato de polpa de *Acrocomia aculeata* (lacq) Lood. ex Mart, submetido à radiação luminosa, por exposição à luz natural, apresentou mudança de coloração devido à oxidação de seus componentes, uma vez que a adição de conservante antioxidante impediu a alteração da coloração.

O aspecto de um fitocosmético, em relação à homogeneidade e coloração do produto, é importante do ponto de vista comercial, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto.

A modificação do odor pode ter ocorrido, provavelmente, por contaminação microbiana, devido ao uso inadequado do produto, como aplicação com a ponta dos dedos, ao invés do uso de espátula; entretanto, nenhuma alteração visual foi notada nos produtos.

O valor de pH dos produtos que foram usados para os ensaios que estão sendo apresentados neste trabalho, está apresentado na Figura 1. Como pode ser verificado, os valores não sofreram alteração maior que 10%, o que representa a manutenção de valores entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo. Valores baixos de pH podem estar relacionados ao aparecimento de irritação dérmica cumulativa (Leonardi, 2002), e ser devido à degradação de qualquer componente do fitocosmético.

A densidade de sistemas emulsionados e não emulsionados não têm apresentado variação significativa. Os valores medidos durante os ensaios de estabilidade diferem entre si, nos produtos dos projetos realizados e em execução no nosso laboratório, em valores inferiores a 10%, razão pela qual está sendo adotado que variação de valores maior que 20% pode significar instabilidade.

Foi possível observar, a partir das Figuras 2 e 3, que a inoculação de microrganismos (amostras 4 a 6, como descrito na Figura 1) pouco alterou a densidade dos cremes. Da mesma forma, durante os 15 dias em que se realizou o teste de estabilidade, a variação entre os valores de densidade entre os cremes e entre as condições a que estavam expostos foi pequena. Foi possível observar na Figura 3 um ligeiro aumento do valor da densidade em relação à outra condição de estresse, isso se deve, provavelmente, a uma maior perda de água, fazendo com que a densidade aumentasse; entretanto, a alteração de densidade das amostras não foi suficiente para determinar se esta propriedade promoveu instabilidade nas preparações ensaiadas.

A variação da viscosidade influenciada por dois diferentes valores de pH (6 e 7), em xampus espessados com diferentes concentrações (entre 2,80 e 3,20%) de cloreto de sódio foi avaliada por Speroto et al. (2007). A viscosidade foi determinada em viscosímetro coaxial, utilizando xampus manipulados com três diferentes concentrações de tensoativo detergente: 15, 25 e 30%. Os resultados mostrados na Tabela 1 indicaram que o pH foi determinante para aumento da viscosidade de xampus; entretanto, a concentração de tensoativos e do agente espessante cloreto de sódio, também influenciaram no valor da viscosidade de xampus (Corrêa et al., 1997; Isaac et al., 1998b; Speroto et al., 2007)

O ensaio para a determinação da espalhabilidade foi executado com 15 voluntários, sendo efetuadas quatro medições por pessoa, quando foram aplicados, no lado interno do antebraço, 4mg de cada amostra de creme fotoprotetor manipulado com diferentes emolientes, espalhados por um período de 10 minutos sobre a pele.

Foram observadas condições ambientais propícias, tais como temperatura de 23 °C e umidade relativa do ar de 60%. Os resultados possibilitaram obter o perfil de espalhabilidade dos emolientes presentes na formulação. Foram realizados testes com sete diferentes emolientes e as medidas das regiões, onde os produtos foram aplicados para a avaliação da espalhabilidade, estão apresentadas na Tabela 2.

As características de espalhamento sobre a pele de uma emulsão fotoprotetora são importantes, tanto do ponto de vista sensorial como de eficácia. Uma emulsão fotoprotetora deve propiciar a sensação correta e esperada pelo consumidor, além de ter espalhamento adequado para garantir o Fator de Proteção Solar (FPS) nominal (Francisco et al., 2001). Usando o conceito de “cascata de emolientes”, é possível a obtenção de emulsões com características sensoriais otimizadas, em relação à espalhabilidade (Pereira et al., 2001, Silva et al., 2004; Isaac et al., 2005).

Nos últimos anos, a inovação tecnológica tem possibilitado o desenvolvimento de novos métodos de análise, com destaque para os métodos calorimétricos, de elevada sensibilidade, capazes de fornecer informações a cerca da energia envolvida em muitos processos, aos quais está associada a liberação e/ou absorção de energia calorífica.

Os métodos calorimétricos juntamente com técnicas analíticas que permitem medir alterações das propriedades químicas e/ou físicas de uma amostra, em função da temperatura, constituem o que se denomina Análise Térmica.

A análise térmica possibilita uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, estudos de reações químicas, avaliação da estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analítica.

Faria et al. (2002) estudaram a estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por três técnicas analíticas: termogravimétrica, termogravimétrica derivada e análise térmica diferencial, concluindo que as técnicas foram adequadas a esse fim. Os autores usaram um módulo simultâneo DSC-TGA da TA-Instruments, modelo SDT 2960, numa faixa de temperatura de 30 a 650 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100ml. min⁻¹ e cadinho de alumina com massa de 10 a 20mg. Foi observado um patamar de estabilidade térmica dos óleos entre 180 e 321 °C e o processo de decomposição térmica ocorreu em uma única etapa, sendo finalizado entre 433 e 478 °C. A estabilidade térmica dos óleos foi determinada através da faixa de temperatura na qual a massa permaneceu inalterada.

A Tabela 6 mostra a temperatura referente à estabilidade e a temperatura final de decomposição dos produtos. Os autores afirmaram que os óleos analisados apresentaram a seguinte ordem crescente de estabilidade: babaçu, murici, guariroba, araticum e buriti, fator determinante no controle de qualidade de óleos e gorduras durante o processamento, estocagem e utilização industrial (Faria et al., 2002)

Solis-Fuentes & Duran-De-Bazua (2003) caracterizaram misturas eutéticas de diferentes composições de óleos e gorduras vegetais por análise térmica (DSC) e concluíram que as gorduras podem suportar misturas com diferentes composições equivalentes à manteiga de cacau e serem aplicadas em produtos cosméticos, entre outros.

Guillen et al. (2006) avaliaram a contribuição da análise térmica na avaliação do DMAE e seus sais correspondentes e do ácido ascórbico e derivados. Os autores encontraram resultados que não conferem com a especificação do laudo, salientando a importância do método no controle de qualidade de substâncias.

A espectrometria de fluorescência é um método confiável, rápido, preciso, de baixo custo, que permite a determinação de princípios ativos, tornando-se um método bastante atrativo em ensaios de controle de qualidade e de estudos de estabilidade. A metodologia de análise pelo espectrofluorímetro é bastante simples, na qual se aplica uma certa energia em uma faixa de comprimento de onda e, por meio de filtros de emissão, pode ser observado um determinado valor de concentração. Em função da curva analítica é possível determinar a concentração da amostra e avaliar a estabilidade da preparação segundo a concentração do ativo

A fluorescência é causada pela absorção de energia radiante e reemissão de parte dela, sob a forma de luz; ou seja, radiação visível. A luz emitida tem, sempre, comprimento de onda maior do que o da absorvida (Bassett et al., 1981). Na prática, isso ocorre quando uma solução é iluminada por um feixe luminoso, de comprimento de onda específico, absorvendo luz e emitindo em um comprimento de onda diferente.

Pytel et al. (2005), estudaram a atividade anti-radicalar, em três áreas da pele de antebraço de voluntárias: uma após incidência de radiação ultravioleta A e B, outra da pele irradiada e tratada com creme contendo complexo antioxidante e a outra região da pele não irradiada e não tratada, através da quantificação de peróxidos, pela aplicação de sonda fluorescente em adesivo específico, que retirou uma amostra do estrato córneo das áreas estudadas. As unidades fluorimétricas obtidas foram usadas para calcular a proteção anti-radicalar.

Os resultados obtidos por Pytel et al. (2005) mostraram que a pele irradiada e tratada com creme contendo o complexo antioxidante testado apresentou concentração 116% menor de peróxidos cutâneos, enquanto a pele tratada com creme sem o complexo antioxidante apresentou concentração 49% menor, o que não foi considerado estatisticamente significativo em comparação à área irradiada.

No ensaio de granulometria por difração a laser, a distribuição de tamanho da partícula é calculada comparando o ensaio de uma amostra com um modelo ótico apropriado. Relkin et al. (2008) estudaram a estabilidade de nanoemulsões óleo em água usando diferentes técnicas e, entre elas, a granulometria, para avaliar a influência da presença de α -tocopherol, como constituinte da fase oleosa,

na distribuição do tamanho das partículas da emulsão. Os autores usaram o equipamento Malvern Mastersizer 2000 Instruments para avaliar a distribuição do tamanho das partículas, após diluição da nanoemulsão em água destilada (H₂O) ou em solução de dodecilsulfato de sódio (DSS) e agitados lentamente por 30 minutos e verificaram, com os resultados, uma proteção ao α -tocoferol.

Para a adequação da medida na elaboração das curvas de distribuição granulométrica de uma amostra, podem ser usados dois princípios de medida: Fraunhofer e Mie. A aproximação de Fraunhofer tem sido usada em instrumentos mais antigos de difração. Supõe que as partículas que estão sendo medidas são opacas e espalham luz em ângulos estreitos. Em consequência, é somente aplicável às partículas grandes e dará uma avaliação incorreta da fração da partícula fina.

A teoria de Mie é mais rigorosa para o cálculo de distribuições de tamanho da partícula dos dados de espalhamento de luz. As intensidades de espalhamento podem ser aplicadas a todas as partículas, pequenas ou grandes, transparentes ou opacas. A teoria de Mie permite um espalhamento preliminar da superfície da partícula, com a intensidade calculada pela diferença de índice de refração entre a partícula e o meio de dispersão. É possível, também, determinar o espalhamento secundário, causado pela refração dentro da partícula - esta é especialmente importante para partículas abaixo de 50 micra de diâmetro, como indicado no padrão internacional para medidas de difração a laser pela ISO13320-1, em 1999 (Kippax, 2007).

Os sistemas se apresentam mais estáveis quando a amostra dispersa em água com agente surfactante, apresentar distribuição homogênea de tamanho de partícula. Tamanhos característicos relativos às proporções em que 10, 50 e 90% do material devem ser determinados. Enquanto o d_{50} representa o tamanho mediano do material, a razão d_{90}/d_{10} oferece uma indicação da homogeneidade granulométrica do material.

Reologia representa o estudo das propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças, com o objetivo de descrever as relações entre as tensões e deformações, através das leis constitutivas ou do comportamento de fluxo. A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo ou excipiente, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, das formulações teste e dos produtos finais (Barry, 1993). Diferentes processos físicos como cremeação ou sedimentação, floculação e coalescência podem ocorrer em sistemas emulsionados e serem investigados usando diferentes técnicas reológicas.

Características sensoriais e desempenho do produto são frequentemente relacionados às suas propriedades reológicas, principalmente às propriedades de fluxo, que determinam a consistência, além de avaliar a fácil espalhabilidade sem escoamento excessivo do produto (Masson, 2005).

Dessa maneira, a caracterização reológica completa, seja pelos ensaios rotacionais, complementados pelos ensaios oscilatórios, possibilita determinar a estabilidade do material ou produto, auxiliando na determinação do prazo de validade.

Ensaio com géis hidrofílicos permitiram determinar o melhor excipiente para veicular pigmento inorgânico para uso como máscara para os cílios. Foram realizados ensaios rotativos e oscilatórios que determinaram o limite de escoamento, a deformação e a recuperação do material, o que representa informações importantes para o desenvolvimento de produtos, uma vez que possibilita inferir que, ao ser aplicada, a máscara não vai apresentar dificuldade para ser retirada da embalagem, vai fluir com facilidade, mas não vai escoar, uma vez que sua recuperação é rápida, após o espalhamento (Gregolin et al., 2008).

Neste teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0,01 a 0,5 Pa, por 180 segundos, para avaliar em que tensão de cisalhamento os géis sofreriam deformação. Essa faixa contém valores bastante baixos de tensão, pois é esperado que um gel flua facilmente, sem haver necessidade de uma força elevada. Pela análise do gráfico, foi possível notar que o gel se deformou dentro dessa faixa, necessitando realmente de uma tensão pequena para isso. Não apresentou picos antes de fluir completamente (Figura 5), demonstrando baixa resistência à deformação e apresentando linearidade entre 0,1 e 1 Pa, ou seja, proporcionalidade entre a tensão aplicada e a resposta obtida (Ribeiro et al., 2004).

No ensaio de fluência e relaxação, foi possível observar que o gel apresentou boa recuperação da parte elástica (Figura 6). A sua característica viscoelástica permite sua utilização como base cosmética para os diferentes tipos de produtos (Gregolin et al., 2008).

Os dados do presente estudo permitem concluir que os ensaios propostos garantem a estabilidade físico-química e a qualidade de fitocosméticos. Assim, o conjunto de ensaios aqui mostrados constitui um protocolo para avaliar a estabilidade físico-química de fitocosméticos, como proposto na Tabela 5 e os ensaios preparados conforme descrito em Material e Métodos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelos financiamentos recebidos do CNPq (Brasília), FINEP (Brasília), FUNDUNESP (São Paulo), FAPESP (São Paulo) e PADCF (Araraquara), pelo apoio aos projetos desenvolvidos nos Laboratórios de Cosmetologia e de Controle Biológico de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

ABSTRACT:

Guide to physical and chemical stability of phytocosmetics

The growing demand for stable, safe and effective cosmetics has required increasingly complex studies by the scientific community and the use of more efficient techniques to determine the stability of these products. The use of active principles from the Brazilian flora has led to the development of numerous products, in the most varied pharmaceutical forms, making it, even more difficult to standardize experimental protocols to certify the stability of cosmetic preparations. While in Brazil there is no one protocol that standardizes the tests that should be carried out to determine product stability, several studies have been conducted in academic laboratories to determine the stability of specific raw materials. The rheological properties of topical use products have to be taken into account in their manufacture, storage and application. The determination of the rheological behavior of a formulation helps in evaluating the physicochemical nature of the vehicle, allowing early signs of physical instability to be detected and thus enabling quality control of the constituents, test formulations and final products. Thermal analysis has also been used to assist in the study of cosmetic stability and differential scanning calorimetry to guide the development of new products. Other tools, such as fluorimetry and laser granulometry can be used to help the study and development of both emulsified and non-emulsified systems. The aim of the present study is to develop a protocol for the investigation of the physical and chemical stability of phytocosmetics - systems containing active compounds extracted from the Brazilian biodiversity.

Keywords: Brazilian biodiversity; physical and chemical stability; phytocosmetic.

REFERÊNCIAS

Archondo AEDL. *Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo extrato de Centella asiática L.* (Urban). [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

Baby AR, Migliato KF, Maciel COM, Zague V, Pinto CASO, Salgado HRN, Kaneko TM, Velasco MVR. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Braz J Pharm Sci* 2007; 43(3):405-12.

Barry BW. *Dermatological formulations*. New York: Marcel Dekker, 1993.

Bassett J, Denney RC, Jeffery GH, Mendham JV. *Análise inorgânica quantitativa*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. p.576-84.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília, 2007.

Bueno JHF, Toni LC, Oliveira AG, Evangelista RC, Jorge Neto J, Mancini B, Lourenço VA. Óleo das sementes de tangerina ponkan – *Citrus reticulata* Blanco. Possibilidades do emprego na estruturação de cremes A/O (cold cream). *Rev Ciênc Farm* 1984; 6:29-37.

Corrêa MA, Bim AVK, Silva BNP, Mazzer DF. Influência do pH sobre a viscosidade de shampoos formulados com a presença ou não de detergentes anfóteros. In: 44ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 1997, p.34.

Davis SS, Burbage AS. Electron micrography of water-in-oil-in-water emulsions, *J Colloid Interface Sci* 1997; 62:361-3.

Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2004; 4(1):33-8.

Faria EA, Lei MIG, Ionashiro M, Zuf TO, Antoniosi Filho NR. Estudos da estabilidade térmica de óleo e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. *Eclét Quim* 2002; 27:1-9.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu; 2001. pt.2. p.146.

Francisco C, Pereira CSC, Marona HRN, Isaac VLB, Bolini HMA. Análise sensorial de uma preparação cosmética emulsionada com filtro solar e vitamina E. In: Anais do 15º Congresso Brasileiro de Cosmetologia; 2001 jul. 24-6; São Paulo, SP. São Paulo Associação Brasileira de Cosmetologia; 2001. p.525-36.

Franco SL, Bueno JHF. Otimização de processo extrativo de propólis. *Infarma* 1999; 11:48-51.

Galhardo NCW, Isaac VLB, Moreira RRD, Pizzolitto AC. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia uniflora L.*, 1º Simpósio Paulista de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007a jun 4-6; Araraquara, SP. Araraquara. 2007a.

- Galhardo NCW, Isaac VLB, Pizzolitto AC, Moreira RRD, Corrêa MA. Óleo de pitanga na higiene oral. *Cosmet Toilet* 2007b; 19(5):64-5.
- Gregolin MT, Chiari BG, Ribeiro HM, Isaac VLB. Caracterização reológica de géis hidrofílicos. In: 25º Congresso Brasileiro de Cosmetologia; 2008 mai 27-9; São Paulo, Br. São Paulo: 2008. CD-Rom.
- Guillen JSQ, Batista IASA, Matos JR. Contribuição da análise térmica na avaliação do DMAE e seus sais correspondentes e do ácido ascórbico e derivados. 5º Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria; 2006 abr 2-5; Poços de Caldas, MG. Poços de Caldas; 2006. Disponível em URL: <http://abrateg.com.br/cbrateg5/trabalhos/399G.pdf>. [10 abr 2008].
- Guideline on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances And Products, Disponível em URL : <http://www.emea.europa.eu/htmls/human/humanguidelines/quality.htm>. [20 jul 2008].
- Idson B. Stability testing of emulsions. *Drug Cosmet Ind* 1988; 103(12):35-8.
- Idson B. Stability testing of emulsions. I. *Drug Cosmet Ind* 1993a; 142(1):27-8.
- Idson B. Stability testing of emulsions. II. *Drug Cosmet Ind* 1993b; 142(2):38-43.
- Iha SM, Migliato KF, Rebuglio JC, Pietro RCL, Isaac VLB, Brunetti IL, Correa MA, Salgado HRN. Estudo fitoquímico de fruto com potencial antioxidante: goiaba (*Psidium guajava* L.) para desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn* 2008 18 (3):21-5.
- Isaac VLB. Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas. [Tese] São Paulo; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 1998a.
- Isaac VLB, Uchiyama CL. Influência da combinação de tensoativos associada a agentes espessantes na viscosidade de xampus. In: 45ª Jornada Farmacêutica da UNESP; 1998 ago 9-14; Araraquara, SP. Araraquara; 1998b. p.11.
- Isaac VLB, Silva TMA, MigliatoKF, Salgado HRN. Qualidade de creme fotoprotetor A/O. *Cosmet Toilet*. 2005; 18(5):58-70.
- Jácome RLR, Oliveira ABO, Raslan DS, Muller A, Wagner, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-pastor). *Quím Nova* 1999; 22:175-7.
- Kippax P. Measuring particle size using modern laser diffraction techniques. Disponível em URL: <http://www.chemie.de/articles/e/61205/>. [20 out 2007].
- Knorst MT, Borghetti GS. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. *Rev Bras Ciênc Farm* 2006; 42(4):531-7.
- Leonardi, G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An. Bras. Dermatol* [periódico on line] 2002; 77 (5). Disponível em URL: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0365-05962002000500006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. [2008 jul 13].
- Masson DS. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes*. [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2005.
- Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Júnior AMB, Trindade RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17(1):108-13.
- Oliveira LC, Bloise MI. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. *Cosmet Toilet* 1995; 7(2):30-7.
- Pereira CSC, Francisco C, Marona HRN, Isaac VLB, Bolini HMA. Análise sensorial de creme para rejuvenescimento facial contendo AHA/BHA e filtros solares. Anais 15º Congresso Brasileiro de Cosmetologia; 2001 jul 24-6, São Paulo, SP: São Paulo, 2001. p.429-45.
- Pombeiro AJL. *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*. Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, 1980, p.345.
- Priest D. Novo ingrediente ativo para a pele. *Cosmet Toilet* 2006; 18(1):62-5.
- Pytel RF, Silva LVN, Nunes AS, Geszteszi JL, Costa A. Estudo *in vivo* de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. *An Bras Dermatol* 2005; 80(3):323-28.
- Relkin P, Yung JM, Kalnin D, Ollivon M. Structural behaviour of lipid droplets in protein-stabilized nano-emulsions and stability of α -tocopherol. *Food Biophys* 2008; (3):163-8.

- Ribeiro HM, Morais JA, Eccleston GM. Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *Intern J Cosmet Sci* 2004; 26(2):47-59.
- Rieger MM. Teste de estabilidade para macroemulsões. *Cosm Toilet* 1996; 8(5):47-53.
- Salvagnini LE, Migliato KF, Isaac VLB, Correa MA, Salgado HRN, Pietro RCLR. Efficacy evaluation of preservatives associated to *Achillea millefolium* extract against *B. subtilis*. *Braz J Microbiol* 2006; 37:75-7.
- Schulz V, Hänsel R, Tyler V. *Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde*. Barueri: Manole, 2002. 386 p.
- Silberman RPS. Espectrofluorimetria. 2006. Disponível em URL: <http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf>. [20 out 2007].
- Silva CR. Bioativos tropicais com eficácia comprovada. *Cosmet Toilet* 2002; 14(1):42-6.
- Silva TMA, Migliato KF, Salgado HRN, Isaac VLB. Quality comparison of W/O photo-protection creams. *Cosmet Toilet* 2004; 119(7):41-6.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LAA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: UFSC, 2000.
- Solis-Fuentes JA, Duran-De-Bazua C. Characterization of eutetic mixtures in different natural fat blends by thermal analysis. *Eur J Lip Sci Tech* 2003; 105(12):742-8.
- Speroto JS, Heguedusch DF, Branco V, Isaac VLB, Corrêa MA Avaliação da viscosidade de xampus espessados com eletrólitos em diferentes pHs. In: 54ª Jornada Farmacêutica da UNESP; 2007 ago 18-24; Araraquara. p.11.
- Teodor AH, Culea MB, Cimpoi CA, Cot AC. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plants extracts. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 18(1):319-23.
- Vilegas W, Cardoso CAL. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: Yunes RA, Cechinel Filho V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. Itajaí: Univali; 2007. p.157-82.