



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARLA CAUANNY VIEIRA COSTA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GLICÓLICO POR MEIO DE
ESPECTROFOTOMETRIA**

RECIFE
2022

Carla Cauanny Vieira Costa Silva

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GLICÓLICO POR MEIO DE
ESPECTROFOTOMETRIA

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Disciplina de TCC2 como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Cristine Almeida de Santana

RECIFE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Carla Cauanny Vieira Costa.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do ácido glicólico por meio de espectrofotometria / Carla Cauanny Vieira Costa Silva. - Recife, 2022.

34 p. : il., tab.

Orientador(a): Danielle Cristine Almeida de Santana

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

1. ácido glicólico. 2. estudo de validação. 3. espectrofotometria. I. Santana, Danielle Cristine Almeida de. (Orientação). II. Título.

680 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: 03/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE CRISTINE ALMEIDA SILVA DE SANTANA
Data: 04/11/2022 08:56:15-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Danielle Cristine Almeida de Santana
(Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDO JOSE MALAGUENO DE SANTANA
Data: 04/11/2022 08:50:07-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Fernando José Malagueño de Santana
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIE CLAIRE CARNEIRO ALBUQUERQUE
Data: 04/11/2022 10:52:28-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Marie Claire Carneiro Albuquerque
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Pámina Rafaela Silva
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha eterna gratidão a Deus, que sempre esteve ao meu lado nos melhores e piores momentos.

A meus pais, Mequineide Maria e Antônio Carlos, que caminharam comigo nesta longa caminhada e me dão tanto apoio que eu poderia chegar à lua, caso eu quisesse. Obrigada por serem os melhores pais do mundo. A minha irmã, Carol Caren, com quais as risadas que conseguia tirar de mim sempre foram como uma luz no fim do túnel. Obrigada por todo amor e carinho que vocês me dão todos os dias. Eu não seria nada sem vocês.

A minha família que esteve, indiretamente, me encorajando todos os dias.

A professora Danielle Cristine, pela paciência, ensino, ajuda e apoio que eu nunca pensei que encontraria. Agradeço por ser uma referência de profissional para mim.

A Vânia e Henrique, por acreditarem em mim antes mesmo de mim mesma e por estarem sempre ao meu lado. Eu não teria palavras suficientes para descrever o quanto vocês me ajudam.

Ao grupo de amigos mais fantástico que alguém poderia ter, Adryell, Camila, Hellen e Lucas, que deixam meus dias coloridos e me fazem esquecer de todos problemas quando estamos juntos. Eu amo vocês.

Aos meus colegas de classe, Amanda, Alberto, Bruna, Daywison, Itala e Jamille, que deixaram meus dias na faculdade mais leves e me ouviram rir e chorar durante todos esses anos. Eu não sei como teria sido sem vocês.

E, por fim, a todos que não foram citados, mas estiveram me dando apoio de alguma forma.

Vocês me fizeram a pessoa que eu sou hoje. E eu sou eternamente grata por isso.

RESUMO

O ácido glicólico é um alfa-hidroxiácido muito utilizado em produtos cosméticos com a finalidade de melhorar marcas de sol, efeito do fotoenvelhecimento, melasma e reduzir rugas e linhas de expressão, e para que se tenha os resultados esperados, ele precisa ultrapassar a primeira barreira da pele, o estrato córneo. De acordo com a ANVISA em 2020, o método padronizado para a quantificação do ácido glicólico é a cromatografia líquida de alta eficiência, porém, com a finalidade de encontrar um método mais barato, rápido e acessível, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica por espectrofotometria na região do UV-visível. A metodologia foi validada de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA de Nº 166, considerando parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção. A linearidade apresentou um coeficiente de correlação de 0,9971 para o intervalo analítico de 7 a 49 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valores escolhidos para manter a absorbância com valor inferior a 1, acordo com a lei de Lambert-Beer. A repetitividade e a precisão intermediária apresentaram valores de coeficiente de variação de 0,85% e 1,09%, respectivamente. Os valores calculados para limites de quantificação foi de 1,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, foi possível verificar a validação desse método de quantificação, e considerando a simplicidade e baixo custo de execução, esse método pode se tornar alternativa válida para a análise de cosméticos que contém o ácido glicólico.

Palavras-chaves: ácido glicólico; estudo de validação; espectrofotometria;

ABSTRACT

Glycolic acid is an alpha hydroxy acid widely used in cosmetic products with the purpose of improving sun marks, photoaging effect, melasma and reducing wrinkles and expression lines and in order to have the expected results, it needs to overcome the first barrier of the skin, the stratum corneum. According to ANVISA in 2020, the standardized method for the quantification of glycolic acid is high performance liquid chromatography, however, in order to find a cheaper, faster and more accessible method, the objective of the work was to develop an analytical methodology by spectrophotometry in the UV-visible region. The methodology was validated in accordance with the Resolution of the Collegiate Board of Directors (RDC) of ANVISA Nº 166, considering parameters of selectivity, linearity, precision, accuracy and limits of quantification and detection. Linearity showed a correlation coefficient of 0.9971 for the analytical range from 7 to 49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, values chosen to keep the absorbance below 1, according to the Lambert-Beer law. Repeatability and intermediate precision showed coefficient of variation values of 0.85% and 1.09%, respectively. The calculated value for quantification limits was 1.26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In this way, it was possible to verify the validation of this quantification method, and considering the simplicity and low cost of execution, this method can become a valid alternative for the analysis of cosmetics that contain glycolic acid.

Keywords: glycolic acid; validation study; spectrophotometry;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camadas da Pele	13
Figura 2 - Penetração de Diferentes Raios de Sol nas Camadas da Pele	14
Figura 3 - Esquema da célula de Franz	16
Figura 4 - Estruturas dos alfa hidroxíácidos mais comumentes usados em cosméticos.....	17
Figura 5 - Esquema da reação de derivatização do ácido glicólico.....	23
Figura 6 - Espectro de absorção	24
Figura 7 - Gráfico de linearidade do ácido glicólico	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de absorvância obtidos em 480nm a partir de amostras de diferentes concentrações do ácido glicólico para elaboração da curva analítica	26
Tabela 2 - Valores de absorvância obtidos em 480nm a partir de amostras de ácido glicólico 3,5 µg/mL para avaliação de limites de detecção e quantificação	27
Tabela 3 - Valores de absorvância média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a repetibilidade da quantificação do ácido glicólico	27
Tabela 4 - Valores de absorvância, média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a precisão intermediária da quantificação do ácido glicólico (Analista 1).....	28
Tabela 5 - Valores de absorvância, média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a precisão intermediária da quantificação do ácido glicólico (Analista 1).	28
Tabela 6 - Valores de absorvância e porcentagem de retenção e percentual extraído usando água como líquido extrator.....	28
Tabela 7 - Valores de absorvância e porcentagem de retenção e percentual extraído usando água e metanol como líquido extrator	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 Pele.....	12
3.2 Envelhecimento Cutânea.....	13
3.3 Absorção percutânea	14
3.4 Estudo de Permeação Cutânea.....	16
3.5 Alfa hidroxiácidos	17
3.6 Ácido glicólico.....	18
3.7 Espectrofotometria	19
3.8 Validação de métodos analíticos.....	20
3.9 Elementos da Validação	20
3.9.1 Seletividade	20
3.9.2 Linearidade	20
3.9.3 Precisão, exatidão e limite de quantificação	20
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Reagentes e Substância de Referência	22
4.2 Metodologia Analítica	22
4.3 Estudos de Retenção de Pele	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Espectrofotometria	24
5.2 Linearidade	25
5.3 Limite de quantificação.....	26
5.4 Precisão e Exatidão.....	27
5.4.1 Repetibilidade	27
5.4.2 Precisão intermediária	27
5.5 Estudos de retenção da pele	28
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A indústria de cosméticos tem mostrado grande expansão no mercado mundial, sendo considerado um importante foco de investimento. Ela tem como atividade a elaboração de produtos para o corpo humano, sendo eles para limpeza, embelezamento ou alteração da aparência sem afetar as funções do corpo (ANVISA, 2022). Na sociedade atual, cada vez mais é procurado produtos que apresentem melhores resultados e diferentes aplicações para que possam atender à demanda da população.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) em 2019, o Brasil estava atrás apenas dos Estados Unidos, Japão e China como países que mais consomem produtos e serviços de beleza. Em 2021, o Brasil alcançou o segundo lugar, ao ultrapassar Japão e China. Isso acontece pelo fato de que o Brasil também pode ser uma grande fonte de princípios ativos e insumos, principalmente os de origem natural (ABIHPEC, 2021).

Os cosméticos estão sendo cada vez mais procurados pela sua eficácia e segurança, a fim de melhorar a aceitação dos consumidores. Alguns desses produtos têm em sua composição alfa-hidroxiácidos, compostos que apresentam baixa toxicidade, apresentando alguns efeitos colaterais caso seu pH seja muito baixo, e podem ser encontrados facilmente em plantas e animais. O ácido glicólico é o alfa-hidroxiácido mais utilizado devido à sua segurança e versatilidade e sua penetração na pele que está relacionada ao seu baixo peso molecular (VAN SCOTT, RUEY, 1996). É usado na prática clínica para melhorar marcas de sol, fotoenvelhecimento, melasma e reduzir rugas e linhas de expressão (DITRE *et al*, 1996).

O local de ação do ácido glicólico, assim como de grande parte dos cosméticos, é a pele. A pele é uma barreira mecânica que serve como proteção ao organismo e se divide em três camadas (epiderme, derme e hipoderme). A camada mais superficial, a epiderme, é constituída de cinco subcamadas, a primeira delas sendo o estrato córneo, que é responsável pela maior resistência à permeação (GUIRRO, GUIRRO, 2002). Por esse motivo, foram realizados estudos que indicaram algumas estratégias que permitem a penetração de compostos na pele com maior facilidade, como a eletroporação, a microporação, a sonoforese, a radiofrequência e a iontoforese (BHARKATIYA, NEMA, 2009).

De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, a determinação do ácido glicólico é preconizada com o método de titulação e por cromatografia líquida de alta eficiência (ANVISA, 2020). Contudo, como desvantagens desses métodos, a titulação não é um método específico para o ácido glicólico, podendo ter um resultado falso positivo, enquanto a cromatografia líquida de alta eficiência é um método mais dispendioso, o que pode ser inacessível para laboratórios de pequeno porte. Um método para determinação do ácido glicólico foi realizado em 1972, por Viccaro e Ambye, onde é realizada uma derivatização com o β -naftol e, assim nesse trabalho foi desenvolvido e validado um método de derivatização com α -naftol e espectrofotometria na região do UV-visível para a determinação do ácido glicólico em soluções de diferentes concentrações, avaliando a exatidão, precisão e linearidade com o objetivo de ser um método mais barato, rápido e com maior acessibilidade e verificar se ele pode ser utilizado para o estudo de retenção na pele.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e validar uma metodologia analítica por espectrofotometria na região do UV-visível para a determinação de ácido glicólico em solução aquosa.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar condições experimentais para a quantificação do ácido glicólico com α -naftol;
- Identificar os parâmetros para melhor desempenho de determinação do fármaco;
- Validar a metodologia desenvolvida para a determinação do ácido glicólico em soluções aquosas de acordo com a RDC Nº 166 de 2017.

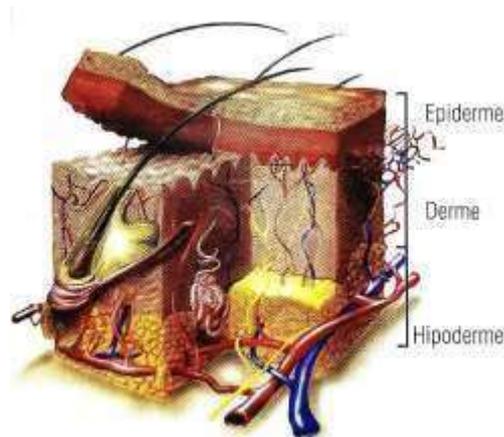
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, apresentando uma área média de 2m², e desempenha diversas funções características da proteção tecidual como o controle da temperatura, a secreção de lipídios, a absorção e secreção de líquidos e a preservação contra agentes externos (GERSON *et al.* 2011). A pele se divide em três camadas: epiderme, derme e, em seguida, hipoderme (Figura 1). A primeira, mais externa, é a epiderme, que está em contato direto com o ambiente, sendo uma estrutura avascular e multilamelar, representando os diferentes estágios da diferenciação celular, dividindo-se em cinco subcamadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (BORGES *et al.* 2010).

É composta por três tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans, sendo predominantemente composta pelos queratinócitos que são formados nas camadas mais profundas e sofrem divisão mitótica empurrando-os para o exterior e nesse processo, as células vão sintetizando a proteína queratina (GAMONAL *et al.* 2002).

Mais detalhadamente, na subcamada basal, a mais interna, estão presentes os queratinócitos e melanócitos, responsáveis pela renovação e pigmentação da pele. Ela é considerada a mais importante dentre as camadas da epiderme por comportar as células capazes de sofrer mitose, o que faz com que a regeneração epidérmica seja possível, se esta camada estiver intacta; em seguida, a espinhosa, que apresenta grande quantidade de queratinócitos; a granulosa é composta por células basófilas de queratohialina; acima dela, a lúcida, estão as células anucleadas e não são vistas quando a pele não é espessa; e a última e mais externa subcamada, a córnea, é onde os queratinócitos se diferenciam e passam a ser chamados de corneócitos, tornando-se células queratinizadas porque conferem uma propriedade de barreira da pele, e atuam contra luz ultravioleta e poluição, por exemplo. A epiderme é atravessada pelos folículos pilosos e glândulas sebáceas e, por ser avascularizada, sua nutrição é mediada pela difusão dos vasos sanguíneos presentes na derme (Figura 1) (HARRIS *et al.* 2009; MOSER *et al.* 2001; BORGES *et al.* 2010).

Figura 1. Camadas da Pele

Fonte: Borges, 2010

A derme é constituída por tecido conjuntivo altamente vascularizado, composta por proteínas estruturais como colágeno e elastina, terminações nervosas e pelas glândulas sebáceas e sudoríparas, que estão diretamente ligadas a epiderme (GERSON *et al.* 2011). As terminações nervosas podem ser livres e encapsuladas, onde as livres são responsáveis pela detecção de dor e temperatura e encapsuladas detectam calor, tato e frio. O colágeno é a proteína estrutural que constitui a maior parte da derme, tendões e ligamentos, relacionada as funções de flexibilidade, proteção contra choques mecânicos, armazenar sangue, entre outros (JAHARA *et al.*, 2010).

A última camada da pele é a hipoderme. Essa camada se divide em duas lâminas: areolar e lamelar. A areolar é composta por adipócitos globulares e volumosos e tem grande quantidade de vasos sanguíneos delicados, enquanto a lamelar apresenta maior mobilização de gorduras (GUIRRO & GUIRRO, 2002). Por ser formada por tecido adiposo, a hipoderme consegue controlar a temperatura corporal, unir e proteger órgãos internos contra choques mecanismos e servir de fonte energética (HARRIS *et al.* 2009).

3.2 Envelhecimento Cutânea

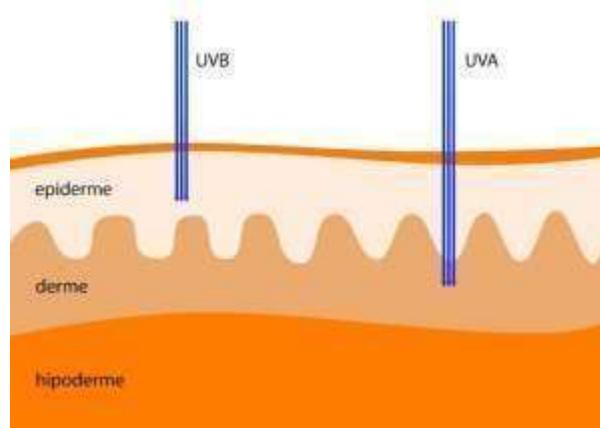
Todos os órgãos envelhecem de forma complexa e multifatorial, mas o órgão que revela mais fácil o processo de envelhecimento é a pele e ele pode acontecer de

duas formas: cronológica e extrínseca. A cronológica está associada a fatores intrínsecos ou fisiológicos, onde a quantidade de fibras de colágeno e elastina diminuem, deixando-a menos flexível, enquanto a forma extrínseca é relacionada a fatores externos, como poluição, medicamentos, pesticidas e estilos de vida, que desorganizam as fibras de colágeno e elastina causando ressecamento, aspereza e rugas (MORIWAKI *et al.* 2008; GARY *et al.* 2002).

Dentre esses fatores, o processo mais comum é fotoenvelhecimento, ou seja, quando é causado pelos raios UV do sol, em especial, os raios UVA, por serem mais penetrantes (Figura 2), aumentando a degeneração das fibras elásticas e colágenas, o que ativa uma complexa série de mecanismos que aceleram o dano na pele, e resultam nas rugas ou manchas pigmentadas e lesões malignas (BORGES *et al.* 2010; PINNELL, 2003).

Os raios UVB, mesmo tendo menor poder de penetração (Figura 2), também pode atingir as fibras elásticas e colágenas, assim como pode danificar o DNA e vasos sanguíneos, o que os deixam mais nocivos por poderem provocar queimaduras e câncer de pele (PINNELL, 2003).

Figura 2. Penetração de diferentes raios de sol nas camadas da pele



Fonte: Autoria Própria

3.3 Absorção percutânea

A pele, dentro de todas as suas funções, também é um local de ação para algumas substâncias e, para que isso aconteça, é necessário que estas consigam atingir as camadas mais profundas da pele, o que acontece por causa da absorção percutânea. A absorção percutânea está relacionada ao movimento de transporte de

uma substância na barreira da pele e esse movimento pode acontecer de três formas: penetração, permeação e ressorção. A penetração é caracterizada pela entrada da substância no estrato córneo, a permeação é quando essa substância o atravessa para outra camada e a ressorção é quando, finalmente, consegue chegar à circulação sanguínea (HOUNG *et al.* 2009).

A absorção de substâncias na pele é influenciada por diversos fatores. Em relação a medicamentos, a escolha da formulação, a fisiologia da pele, a propriedade físico-química dos solutos ou mesmo a presença de força motriz adicional, como ocorre com os métodos eletricamente assistidos, podem influir na absorção. Isso revela que o local de aplicação e as características do produto (polaridade, estrutura química, concentração, entre outros), influenciam diretamente em como ele vai ser, ou não, absorvido pelo corpo (CHERUVU *et al.* 2020). A permeação pode ocorrer, na pele intacta, por dois tipos de rotas: intercelular ou transcelular, ou seja, por entre ou através dos corneócitos respectivamente; ou através dos apêndices da pele (glândulas sebáceas e sudoríparas e o folículo piloso), mesmo que esses apêndices ocupem um espaço muito pequeno na superfície da pele, ele ajuda na penetração das substâncias que não conseguem ultrapassar a pele íntegra (MOSER *et al.* 2001).

A permeação pode ser descrita, matematicamente, pela lei de Fick (BACH *et al.* 1998):

$$J = \frac{D_B \times c_{SB}}{l} \times \frac{c_V}{c_{SV}}$$

Em que:

J= Fluxo de fármaco

Db= Coeficiente de difusão do fármaco

csb= Solubilidade do fármaco no estrato córneo

cv= Concentração do fármaco no veículo

l= Espessura do estrato córneo

csv= Solubilidade do fármaco no veículo

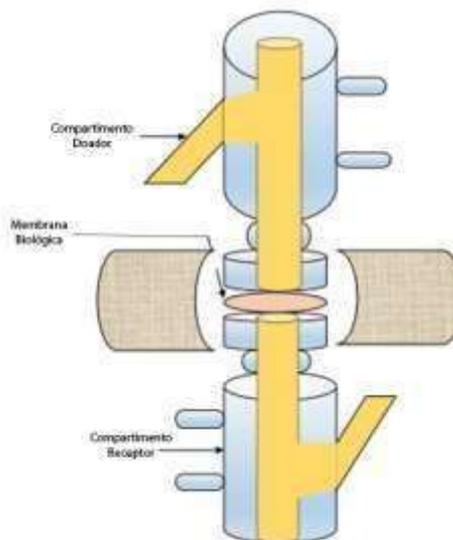
Assim é possível perceber que a permeação cutânea é diretamente proporcional à concentração da substância aplicada sobre a pele e inversamente proporcional à espessura do estrato córneo.

3.4 Estudo de Permeação Cutânea

Os estudos de permeação cutânea podem ser realizados *in vivo* ou *in vitro*, para avaliar parâmetros farmacocinéticos e a permeação de fármacos, respectivamente. De acordo com a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), para os testes *in vitro* são usadas células de Franz para a realização dos estudos, usando membranas biológicas como pele humana, de cobra, porco ou rato (Figura 3) (ILIOPOULOS *et al*, 2020).

Esse modelo é bicompartimental, coloca-se o fármaco em um compartimento, chamado de compartimento doador e o outro é chamado de compartimento receptor; separados por uma membrana. Normalmente a pele da orelha do porco é a membrana mais empregada nesse modelo por ter grande semelhança com a pele humana, como a espessura do estrato córneo e a composição lipídica (MAIONE-SILVA, 2016). A formulação com o fármaco é colocada em contato direto com a pele, para que ocorra a difusão, sob temperatura e agitação controladas.

Figura 3. Esquema da célula de Franz



Fonte: Sivaraman, 2015

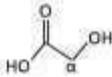
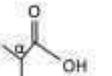
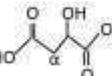
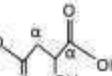
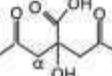
Com esse design experimental, é possível quantificar o fármaco que estava

presente no compartimento doador, que ficou retido nas diferentes camadas da pele (por um método chamado *tape stripping*) e que atravessou a membrana até o compartimento receptor, afim de calcular o fluxo da molécula através da pele (MOSER et al., 2001).

3.5 Alfa hidroxiácidos

Os alfa hidroxiácidos são ácidos carboxílicos com um grupo hidroxila ligado ao primeiro carbono, conhecido como o carbono alfa.

Figura 4. Estruturas dos alfa hidroxiácidos mais comumente usados em cosméticos

AHAs		Estrutura	Peso Molecular
Ácido Glicólico	$C_2H_4O_3$		72
Ácido Láctico	$C_3H_6O_4$		90
Ácido Málico	$C_4H_6O_5$		134
Ácido Tartárico	$C_4H_6O_6$		150
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$		192

Fonte: TANG; YANG, 2018

São moléculas pequenas polares, bastante solúveis em água que podem ser encontradas facilmente na natureza, como em frutas, mas também podem ser sintetizadas. Como importantes representantes desse grupo aparecem os ácidos glicólico, cítrico, málico, tartárico e láctico (Figura 4), que são muito utilizados em cosméticos pelas suas propriedades anti envelhecimento, reduzindo as rugas, aumentando a hidratação da pele, que pode ser explicado pela sua solubilidade, ou diminuindo sinais de queimaduras de sol (VIDT *et al.* 1997).

Mesmo tendo resultados comprovados desde 1974, por Van Scott e Yu, o mecanismo de ação desses ácidos ainda não é totalmente claro, mas sabe-se que eles causam descamação do epitélio, aumenta proliferação celular e produção de colágeno, e reduzem a coesão dos corneócitos, induzindo a ceratólise (BABILAS *et al.* 2012).

Os alfa hidroxiácidos são substâncias consideradas seguras, porém efeitos colaterais podem aparecer a depender do seu pH e concentração. Quanto mais baixo o pH, maior a probabilidade de causar uma irritação, então é necessário que seu pH seja ajustado quando for colocado em uma formulação (TANG *et al.* 2018). Eles podem aparecer em diferentes concentrações no mercado, entre 5-10% para tratamentos mais superficiais, como rugas leves e melhorar a aparência da pele, até 70% para *peeling*, já que conduz a epidermólise (JAHARA *et al.* 2008).

3.6 Ácido glicólico

O ácido glicólico, um alfa-hidroxiácido, também pode ser chamado de ácido 2-hidroxietanoico pela nomenclatura IUPAC, é um ácido orgânico que contém um grupo hidroxila no carbono alfa, o carbono adjacente àquele do grupo carboxila. É uma molécula hidrossolúvel, o que a torna mais difusa na fase intracelular, e sua fórmula química é $C_2H_4O_3$, ácido hidroxiacético, o que faz com que esse ácido seja um dos mais simples e menores alfa-hidroxiácidos e um dos mais usados nos produtos cosméticos, pela sua alta absorção (ANDERSEN *et al.* 1998).

Ele é encontrado em fontes naturais como no caldo de cana-de-açúcar e pode ser sintetizado a partir do ácido cloroacético e hidróxido de sódio. É comercializado como um produto cosmético nas concentrações de 5 a 15%, acima disso é usado apenas como *peeling* químico. *Peeling* químico se trata de uma injúria controlada na pele realizada pela aplicação de uma substância química, favorecendo o seu rejuvenescimento e pode ser de três tipos: superficial, médio e profundo. O ácido glicólico é um exemplo de substância ativa empregada no *peeling* superficial, quando nas concentrações de 20 a 70% (MANALOTO *et al.* 1999).

Esse ácido apresenta várias funções e algumas de suas funções terapêuticas são: a remoção da pigmentação epidérmica excessiva, fazendo com que haja aumento na produção das células normais não danificadas; redução da espessura do estrato córneo hiperqueratinizado, pela diminuição da coesão dos corneócitos presentes nessa camada; promoção da redução de lentigos e hipermelanose induzidas pelo sol (THIBAUT *et al.* 1998); aumento da produção de colágeno, assim melhorando o antienvhecimento da pele (HASHIN *et al.* 2014); melhoria na aparência das rugas, pelo efeito indireto da formação de um eritema e indução da

liberação de citocinas (FUNASAKA *et al.* 2001); e no tratamento da acne (FURUKAWA e YAMAMOTO, 2006).

Ele não apresenta efeito sistêmico significativo e o *Cosmetic Ingredient Review Expert Panel* aprovou, em 1996, o uso do ácido glicólico nos cosméticos. Como condição para essa aprovação, é estabelecido que a concentração do ácido glicólico deve estar abaixo de 10% e o pH superior a 3,5, uma vez que esses parâmetros se mostraram seguros para evitar o aumento da sensibilidade ao sol (ANDERSEN *et al.* 1998).

Nesse contexto, é necessário que haja um controle de qualidade dos produtos cosméticos que apresentem o ácido glicólico em sua composição. De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, a determinação do ácido glicólico é preconizada com o método de titulação e por cromatografia líquida de alta eficiência (ANVISA, 2020). Com o intuito de otimizar a determinação, é buscado técnicas que favoreçam a quantificação por métodos que apresentem um baixo custo e que seja seletivo, podendo garantir a segurança dos produtos com o ácido glicólico.

3.7 Espectrofotometria

Os métodos espectroscópicos apresentam respostas pela interação da matéria com energia eletromagnética. Essa interação depende da concentração da amostra, da estrutura química, da frequência da energia utilizada e da intensidade, o que vai interferir na sensibilidade e na seletividade do método. A utilização dessa metodologia pode ser usada desde a identificação até a quantificação de substâncias, enquanto de acordo com a concentração, sua interação sempre vai relevar uma relação proporcional e direta, a seletividade é definida pela estrutura química analisada (GIL, 2007; ANVISA, 2010).

A espectrofotometria de absorção é dividida em ultravioleta, visível (UV-VIS) e infravermelho. A diferença entre elas varia de acordo com a faixa de comprimento de onda. A ultravioleta tem o intervalo de 190 - 380 nm, a luz visível de 380 - 780 nm e infravermelho de 780 nm - 300 mm (ANVISA, 2010).

Por ser uma técnica de relativo baixo custo, com uma ampla quantidade de aplicações, ser rápida e simples, vem sido muito utilizada pela indústria farmacêutica em substituição a técnicas que utilizem uma maior quantidade de solventes, serem mais dispendiosas e demandem maior tempo (ALVES, 2010).

3.8 Validação de métodos analíticos

Os estudos de validação de métodos analíticos é a confirmação por testes e a evidência objetiva que os requisitos específicos para um uso específico seja cumprido. O método de validação para determinação de algum analito deve apresentar o mínimo de possíveis problemas potenciais, com parâmetros adequados, sendo reprodutíveis e representativos, que não ocorra variabilidades no seu desenvolvimento e seja verificado a sua segurança e eficácia (EKECHUKWU *et al*, 2006).

De acordo com a ANVISA, em 2017, para a análise de insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, os parâmetros para serem avaliados na validação são: exatidão, precisão - repetibilidade, precisão intermediária, seletividade, limite de quantificação, linearidade e intervalo, assim podendo criar uma garantia de qualidade.

3.9 Elementos da Validação

3.9.1 Seletividade

É a capacidade do método em detectar o analito com distinção, na presença de substâncias que podem interferir, potencialmente, na medição, como ingredientes ativos, outros analitos, impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2017).

3.9.2 Linearidade

É a capacidade do método de detectar e oferecer respostas analíticas que dependem das concentrações das amostras, em uma representação gráfica, mostrando relação diretamente proporcional. De acordo com a Anvisa, um coeficiente de correlação, calculado a partir da representação gráfica, é considerado satisfatório se estiver acima de 0,99 (BRASIL, 2017).

3.9.3 Precisão, exatidão e limite de quantificação

Na precisão é avaliada a proximidade dos resultados com amostras de mesma concentração, assim sendo expressada pela repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. Ela é avaliada em um determinado período de tempo, pelo mesmo analista, com o mínimo de nove determinações em três diferentes concentrações. Os valores dos coeficientes de variação devem ser menores de 5% para que o método seja considerado satisfatório. Para o resultado da precisão, é necessário realizar o cálculo determinado pela equação de desvio padrão relativo, sendo ela: $DPR=(DP/CMD) \times 100$. A exatidão expressa o grau de concordância entre os resultados individuais.

Por sua vez, o limite de quantificação permite calcular a menor quantidade de analito que pode ser quantificada na amostra sob as condições experimentais estabelecidas e pode ser determinado pela equação:

$$LQ = 10 \frac{DP}{B}$$

Onde LQ limite de quantificação, DP é o desvio padrão das curvas de calibração construídas (no mínimo 3) que foram feitas usando a concentração próxima ao limite; e B é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2017).

Essas informações precisam ser documentadas para que a qualidade, confiança e consistência do método possam ser avaliadas e reproduzidas pelos laboratórios.

4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes e Substância de Referência

Foram utilizados o ácido glicólico (FLORIEN® lote 21F17-B003-D81134 - Conteúdo 70%), α -naftol 1% ($C_{10}H_8O$, 1-hidroxinaftaleno), ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , sulfato de hidrogênio) e hidróxido de sódio 0,01N (NaOH). Água deionizada de alta pureza foi obtida pelo Ultrapurificador Direct-Pure (Purelab clássico DI, Elga, UK).

Peles de orelhas de porco de animais recentemente sacrificados no matadouro foram obtidas após remoção das cartilagens e tecido gorduroso com o auxílio de pinças e bisturis. As peles foram congeladas até no máximo 30 dias antes do uso.

4.2 Metodologia Analítica

A análise quantitativa do ácido glicólico foi feita por espectrofotometria a partir do estudo de Viccaro e Ambye (1972).

Considerando o que foi observado por Viccaro e Ambye, que o pH do meio influencia diretamente a absorbância máxima do ácido glicólico, inicialmente foram preparadas duas soluções de ácido sulfúrico na concentração de 92,5% e 80%, pela adição de 7 mL de água purificada em 100 mL do ácido concentrado ou pela adição de 37 mL de água purificada, respectivamente.

Uma solução de α -naftol 1% foi preparada pela dissolução de 100 mg do α -naftol em 100 mL de ácido sulfúrico na concentração de 92,5. Em seguida, a solução foi armazenada em frasco ambar, protegida da luz, a 4°C.

A reação de derivatização foi iniciada alcalinizando (pH 8) as amostras de ácido glicólico com a solução de NaOH. Em seguida, as amostras foram colocadas na estufa numa temperatura de 125 a 130°C até completa secura. Após secagem, 1 mL do reagente α -naftol foi adicionado as amostras de ácido glicólico, as quais foram agitadas em vortex, para sua completa dissolução, e transferidas para banho-maria por 20 minutos. Em seguida, 4 mL de ácido sulfúrico 80% foi adicionado em cada amostra, a qual foi agitada em vórtex e mantida em repouso sob a bancada 10 minutos a temperatura ambiente, antes da análise. Todo o processo foi realizado no mesmo dia, protegido da luz, para garantir a estabilidade dos reagentes.

Para determinar a linearidade, as concentrações das amostras de ácido glicólico escolhidas foram de 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Para os limites de quantificação a concentração escolhida foi de 3,5 $\mu\text{g/mL}$. A precisão e a exatidão foram feitas em dois dias diferentes por dois analistas diferentes com amostras de ácido glicólico nas concentrações de 14, 35 e 42 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e passaram pelo processo descrito anteriormente. O espectrofotômetro foi configurado para realizar uma varredura entre as ondas de 400nm a 700nm, ou seja, entre o espectro de luz visível, usando cubetas de vidro com comprimento de 1,0 cm e água destilada como branco da análise.

4.3 Estudos de Retenção de Pele

Para avaliar a aplicabilidade da metodologia analítica desenvolvida em estudos futuros de permeação cutânea *in vitro*, foi realizado um estudo de extração do ácido glicólico a partir do estrato córneo pela técnica de *tape stripping*. Para tanto, a pele das orelhas de porco foi colocada numa superfície lisa e o estrato córneo foi retirado com o auxílio de fitas adesivas (Durex®, 3M). Foram utilizadas 15 fitas adesivas para a retirada do estrato córneo. Em seguida, as fitas foram colocadas em um tubo plástico de fundo cônico e foi adicionado 17,5 mg de ácido glicólico, num volume em que sua concentração fosse de 35 $\mu\text{g/mL}$.

O estudo foi realizado com dois líquidos extratores diferentes: água ultrapura e solução de água : metanol (1:1 v/v). O solvente extrator (10mL) foi adicionado ao tubo com as fitas e submetido à agitação no vórtex por 5 minutos. Em seguida, foi colocado num banho ultrassônico por 5 minutos e as amostras foram filtradas. Por fim, o filtrado foi submetido ao procedimento descrito anteriormente para o processo de derivatização e determinação do ácido glicólico. O estudo foi feito em duplicata e usando como branco apenas os líquidos extratores.

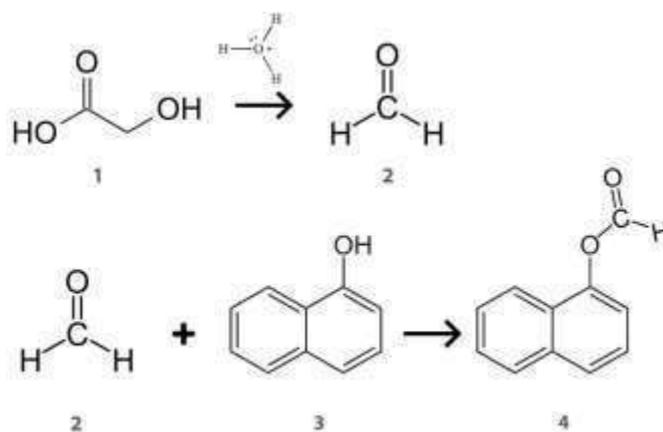
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ácido glicólico usado no estudo (solução aquosa a 70% m/m, pH 1,8 e densidade igual a 1) apresentou características organolépticas, pH e densidade conforme descrito na literatura (VAN SCOTT; DITRE; YU; 1996).

A quantificação do ácido glicólico foi testada inicialmente utilizando amostras contendo apenas o ácido, mas seus resultados não foram reprodutíveis, devido a sua instabilidade. Por conta disso, foi necessário realizar o processo de derivatização do ácido glicólico. Ele se inicia com a sua conversão em sal de sódio pela adição do hidróxido de sódio, para que durante a evaporação, não ocorra a decomposição da amostra. Somado a isso, a evaporação também é positiva para eliminar possíveis reagentes como formaldeído e acetaldeído.

Em seguida, para a devida quantificação por espectrofotometria, a derivatização é resultante da reação de Baeyer, ou seja, uma condensação ácida de formaldeído com fenóis. O ácido sulfúrico adicionado promove a hidrólise do ácido glicólico formando um formaldeído que vai reagir com a hidroxila do α -naftol, gerando um composto chamado de metilenoalfanaftol. Esse composto é oxidado pelo ácido sulfúrico e apresenta a cor âmbar (Figura 5).

Figura 5. Esquema da reação de derivatização do ácido glicólico: (1) ácido glicólico; (2) formaldeído; (3) α -naftol; e (4) metilenoalfanaftol.

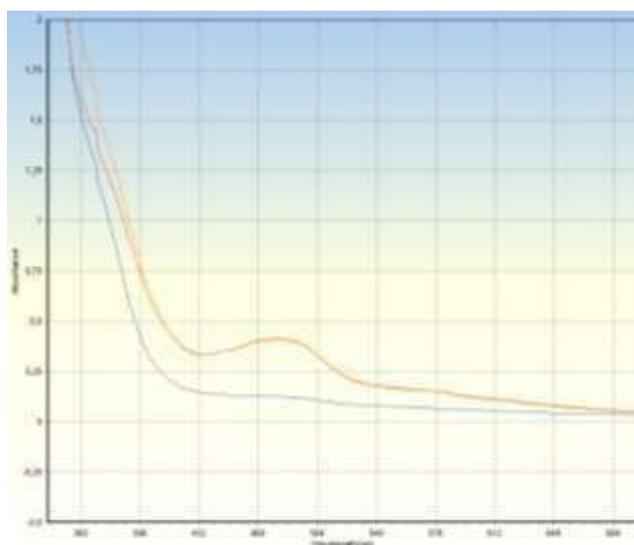


Fonte: Autoria própria

5.1 Espectrofotometria

A definição do comprimento de onda adequado foi mostrado no espectro de absorção onde o pico máximo para as curvas foi de 480nm (Figura 6).

Figura 6. Espectro de absorção: (linhas laranja e amarelo) duplicatas de uma mesma concentração; (linha azul) branco.



Fonte: Autoria Própria

5.2 Linearidade

Para avaliação do parâmetro de linearidade foram utilizadas amostras na faixa de concentração de 7 a 49 $\mu\text{g/mL}$ para construção de curva de calibração com ajuste de regressão linear. Os dados obtidos para a construção da curva analítica estão representados na Tabela 1.

A curva analítica obtida para quantificação do ácido glicólico está apresentada na Figura 7.

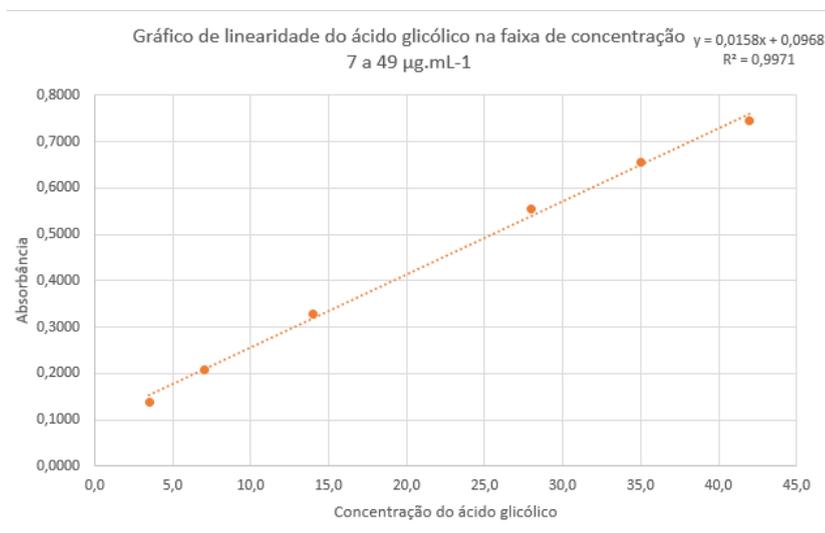
O valor do coeficiente de determinação (R^2) calculado a partir da curva de calibração realizada em triplicata foi de 0,9971, indicando comportamento linear entre as concentrações de ácido glicólico e os valores de absorbância. Com isso foi visto que o método demonstrou ser linear, que é dito pelo valor do coeficiente de correlação maior que 0,99 (BRASIL, 2017) (Figura 8).

Tabela 1. Valores de absorvância obtidos em 480nm a partir de amostras de diferentes concentrações do ácido glicólico para elaboração da curva analítica.

Concentração (µg/mL)	Absorbâncias (média)	DPR%
3,5	0,1368	0,0038
7,0	0,2091	0,0032
14,0	0,3277	0,0029
28,0	0,5552	0,0108
35,0	0,6560	0,0006
42,0	0,7435	0,0091
49,0	0,8489	0,0072

Figura 7. Curva analítica do ácido glicólico na faixa de concentração de 3,5 a 49 µg.mL⁻¹.

Equação da reta: $y = 0,0158x + 0,0968$; coeficiente de determinação: $R^2 = 0,9971$



A inclinação da reta média obtida foi de 0,0158, o valor do coeficiente de correlação, ou seja, o R médio, é de 0,9971.

5.3 Limite de quantificação

A partir do intercepto da média e dos valores de desvio padrão da quintuplicata de uma solução de trabalho de ácido glicólico na concentração de 3,5 µg.mL⁻¹ foi obtido o valor do limite de quantificação a partir da fórmula. Sendo ele de 1,26 µg.mL⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de absorvância obtidos em 480nm a partir de amostras de ácido glicólico 3,5 µg/mL para avaliação do limite de quantificação.

Concentração (µg/mL)	Absorbâncias (média)	DPR%
3,5	0,1369	0,002

5.4 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foi avaliada através dos ensaios de repetitividade e precisão intermediária, sendo a precisão verificada pelo desvio padrão relativo e concentração média e a exatidão foi verificada contemplando o intervalo linear do método analítico.

5.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi feita usando 3 concentrações que contemplassem o intervalo linear das amostras, sendo elas 14, 35 e 42 µg/mL e foi determinado a média, desvio padrão e o coeficiente de variação dos valores (Tabela 2.).

Tabela 3. Valores de absorvância média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a repetibilidade da quantificação do ácido glicólico.

Concentração (µg/mL)	Absorbâncias (média)	DPR%	Coeficiente de Variação%
14,0	0,3276	0,0034	1,0574
35,0	0,6568	0,0001	0,0215
42,0	0,7464	0,0110	1,4778

A média do coeficiente de variação foi de 0,85%, o que, de acordo com a ANVISA, o método apresenta uma boa repetitividade, pois este valor é inferior a 5%.

5.4.2 Precisão intermediária

Os resultados para a precisão intermediária foram realizados em dias diferentes com analistas diferentes (Tabela 3.).

Tabela 4. Valores de absorvância, média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a precisão intermediária da quantificação do ácido glicólico (Analista 1).

Concentração (µg/mL)	Absorbâncias (média)	DPR%	Coeficiente de Variação%
14,0	0,3276	0,0034	1,0574
35,0	0,6568	0,0001	0,0215
42,0	0,7464	0,0110	1,4778

Tabela 5. Valores de absorvância, média, desvio padrão e coeficiente de variação para verificar a precisão intermediária da quantificação do ácido glicólico (Analista 2).

Concentração (µg/mL)	Absorbâncias (média)	DPR%	Coeficiente de Variação%
14,0	0,3212	0,0031	0,9905
35,0	0,6737	0,0051	0,7661
42,0	0,7324	0,0166	2,2784

A média do coeficiente de variação dos analistas é de 1,09%, e como o valor é inferior a 5%, o método pode ser considerado satisfatório quanto a esse parâmetro.

5.5 Estudos de retenção da pele

Os testes para a retenção da pele foram realizados para avaliar a aplicabilidade do método. Foi usado água destilada como o branco e uma solução de ácido glicólico 35 µg/mL para a comparação com a retenção da pele. Os valores das absorvâncias no estudo de retenção na pele estão descritos nas tabelas 6 e 7:

Tabela 6. Valores de absorvância e porcentagem de retenção e percentual extraído usando água como líquido extrator

Amostras	Absorbâncias	Porcentagem de Retenção
Branco	0,1198	
Ácido Glicólico 35 µg/mL	0,6560	
Amostra 1	0,4455	67,91%
Amostra 2	0,4561	69,52%

Tabela 7. Valores de absorvância e porcentagem de retenção e percentual extraído usando água e metanol como líquido extrator

Amostras	Absorbâncias	Porcentagem de Retenção
Branco	0,1256	
Ácido Glicólico 35 µg/mL	0,6560	
Amostra 1	0,4166	63,50%
Amostra 2	0,4097	62,45%

Com esses valores foi visto que não houve uma extração completa do ácido glicólico, não sendo possível identificar a ação no estrato córneo. O método apresentou uma especificidade maior que o método de titulação, porém verifica-se uma dificuldade de avaliar a retenção do ácido na pele através dele. Um possível mecanismo para contornar esse problema pode ser a realização de estudos futuros de permeação cutânea para verificar o efeito nas camadas da pele.

6. CONCLUSÃO

A metodologia espectrofotométrico para determinação do ácido glicólico em soluções aquosas atendeu os parâmetros de validação conforme as normas da RDC Nº 166, apresentando uma boa especificidade, o valor de linearidade com $R > 0,99$ e precisão com os valores de coeficiente de variação menores de 1,09%. Assim, o método se apresenta como uma possível alternativa para quantificação do ácido glicólico, com as vantagens de ter baixo custo e ser acessível para laboratórios de menor porte.

O estudo preliminar de retenção na pele pelo método de *tape stripping*, no entanto, não se mostraram eficientes para identificação do ácido. Assim, é necessário a realização de estudos futuros mais específicos, visando futuras aplicações.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC – A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama global de consumo de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos marcam o primeiro dia da Semana ABIHPEC de Mercado 2022**. São Paulo, 13 set. 2022. Disponível em: <https://abihpec.org.br/release/panorama-global-de-consumo-de-produtos-de-higiene-pessoal-perfumaria-e-cosmeticos-marcam-o-primeiro-dia-da-semana-abihpec-de-mercado-2022/> Acesso em: 01 out. 2022.
- ALVES, Lariza Darlene Santos et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, p. 1967-1972, 2010.
- ANDERSEN, F. A. Final report on the safety assessment of glycolic acid, ammonium, calcium, potassium, and sodium glycolates, methyl, ethyl, propyl, and butyl glycolates, and lactic acid, ammonium, calcium, potassium, sodium, and TEALactates, methyl, ethyl, isopropyl, and butyl lactates, and lauryl, myristyl, and cetyl lactates. **International Journal of Toxicology**, v. 17, n. 1_suppl, p. 1-241, 1998.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª ed. Brasília, 2010.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes**. Brasília, 04 dez. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/cosmeticos/conceitos-e-definicoes> Acesso em: 02 set. 2022.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. Brasília, 23 out. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-controle-de-qualidade-de-produtos-cosmeticos.pdf/view> Acesso em: 25 out. 2022.
- BABILAS, P.; KNIE, U.; ABELS, C. Cosmetic and dermatologic use of alpha hydroxy acids. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 10, n. 7, p. 488-491, 2012.
- BACH, M.; LIPPOLD, B. C. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 46, n. 1, p. 1-13, 1998.
- BHARKATIYA, M.; NEMA, R. K. Skin penetration enhancement techniques. **Journal of Young Pharmacists**, v. 1, n. 2, p. 110, 2009.
- BORGES, F. S. **Dermato Funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. 2º ed. São Paulo: Phorte, 2010.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 141, 2017.

CHERUVU, H. S. et al. Modeling percutaneous absorption for successful drug discovery and development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 10, p. 1181-1198, 2020.

DITRE, C. M.; GRIFFIN T. D.; MURPHY G. F.; SUEKI H.; TELEGAN B.; JOHNSON W. C.; YU R. J.; SCOTT E. J. Effects of α -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 187-195, 1996.

EKECHUKWU, Amy et al. Validation of analytical methods and instrumentation for beryllium measurement: Review and summary of available guides, procedures, and protocols. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 6, n. 12, p. 766-774, 2009.

FUNASAKA, Y. et al. The efficacy of glycolic acid for treating wrinkles: analysis using newly developed facial imaging systems equipped with fluorescent illumination. **Journal of dermatological science**, v. 27, p. 53-59, 2001.

FURUKAWA, F.; YAMAMOTO, Y. Recent advances in chemical peeling in Japan. **The Journal of dermatology**, v. 33, n. 10, p. 655-661, 2006.

GAMONAL, A. **Dermatologia elementar: compêndio de dermatologia**. 2ª ed. Juiz de Fora: A. Gamonal, 2002.

GARY, J. Fisher et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

GERSON, J. et al. **Fundamentos de estética 4: estética**. Tradução da 10ª Edição Norte Americana. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

GIL, Eric de Souza. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. In: **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2010. p. 511-511.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia em Estética: Fundamentos, recurso e etiologías**. 2002.

HARRIS, M. I. N. D. C. **Pele-estrutura, propriedades e envelhecimento**. Senac, 2009.

HASHIM, P. The effect of Centella asiatica, vitamins, glycolic acid and their mixtures preparations in stimulating collagen and fibronectin synthesis in cultured human skin fibroblast. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 2, 2014.

HUONG, S. P. et al. Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. **Skin Research and Technology**, v. 15, n. 3, p. 253-261, 2009.

ILIOPOULOS, F. et al. Franz cell diffusion testing and quantitative confocal raman spectroscopy: In vitro-in vivo correlation. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 887, 2020.

JAHARA, R. **Dermato-funcional, modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. Capítulo sobre terapêutica por ácidos (peeling químico)**. São Paulo: Phorte, 2010.

MAIONE-SILVA, L. et al. **Encapsulação da vitamina c em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica in vitro em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2016.

MANALOTO, R. M. P.; ALSTER, T. S. Periorbital rejuvenation: a review of dermatologic treatments. **Dermatologic surgery**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 1999.

MORIWAKI, S.; TAKAHASHI, Y. Photoaging and DNA repair. **Journal of dermatological science**, v. 50, n. 3, p. 169-176, 2008.

MOSER, K.; et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2003.

SIVARAMAN, A.; BANGA, A. Formulation and evaluation of sublingual delivery of piroxicam using thermosensitive polymer with an inverted Franz diffusion cell. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 26-35, 2016.

TANG, S.; YANG, J. Dual effects of alpha-hydroxy acids on the skin. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 863, 2018.

THIBAUT, P. K.; WLODARCZYK, J.; WENCK, A. A double-blind randomized clinical trial on the effectiveness of a daily glycolic acid 5% formulation in the treatment of photoaging. **Dermatologic surgery**, v. 24, n. 5, p. 573-578, 1998.

VAN SCOTT, Eugene J.; DITRE, Chérie M.; RUEY, J. Yu. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 2, p. 217-226, 1996.

VAN SCOTT, EUGENE. J.; RUEY, J. Y.. Control of keratinization with a-hydroxy acids and related compounds: I. Topical treatment of ichthyotic disorders. **Archives of Dermatology**, v. 110, n. 4, p. 586-590, 1974.

VICCARO, John P.; AMBYE, Edith L. Colorimetric determination of glycolic acid with β -naphthol. **Microchemical Journal**, v. 17, n. 6, p. 710-718, 1972.

VIDT, D. G.; BERGFELD, W. F. Cosmetic use of alpha-hydroxy acids. **Cleveland**

Clinic journal of medicine, v. 64, n. 6, p. 327-329, 1997.