UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LEONARDO RODRIGUES DE PAULA

Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

08 / 11 / 2010

LEONARDO RODRIGUES DE PAULA

Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Koiti Araki

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Paula, Leonardo Rodrigues de
P324d Determinação *in vitro* do fator de proteção solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados. -- São Paulo, 2010.
124p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Araki, Koiti

1. Fotoquímica inorgânica 2. Produtos químicos inorgânicos : Tecnologia 3. Nanotecnologia I. T. II. Araki, Koiti, orientador.

546.55 CDD

Leonardo Rodrigues de Paula

Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Aprovado em: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial à minha esposa Josy pela compreenção e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Dedico este trabalho a meus pais Sinomar e Anair e aos meus irmãos Frederico e Gabriela.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito"

(*Francisco Cândido Xavier*)

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos às pessoas que cruzaram o meu caminho nesses anos de USP, que colaboraram com críticas e sugestões, que me incentivaram nos momentos de desânimo, que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável e que por isso contribuíram para esta realização.

Muito especialmente, desejo agradecer ao meu orientador Prof. Doutor Koiti Araki, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação, competência e profissionalismo. Muito obrigado!

Agradeço ao André Parussulo, pelas discussões técnicas, pelo entusiasmo e vontade de trocar conhecimentos, pelas acolhidas em sua residência nos períodos em que precisei realizar os experimentos na USP, e principalmente pela grande amizade que construímos.

Agradeço à Natura Cosméticos S.A., na pessoa de Cláudia Leo, pelo incentivo na iniciação desse projeto e à Johnson & Johnson Brasil, na pessoa de Sérgio Luiz de Oliveira, pelo entusiasmo e apoio para que eu pudesse continuar esse projeto, entendendo a importância da busca pelo aperfeiçoamento acadêmico como forma de crescimento profissional.

Resumo

Paula, Leonardo. R.; Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas usando dispositivos fotoquímicos nanoestruturados. 124 pg. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de protetores solares atualmente é uma exigência regulatória na grande maioria dos países e blocos econômicos mundiais. Para tal, adota-se exclusivamente o uso de métodos que requerem a irradiação UV de voluntários humanos nos procedimentos de determinação do FPS. Alguns métodos *in vitro* não-invasivos estão descritos na literatura, mas até o momento nenhum deles foi aceito pela comunidade internacional para a determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas. Portanto, o desenvolvimento de métodos para a determinação do FPS *in vitro*, com boa correlação com os métodos *in vivo*, é de enorme interesse de pesquisadores e empresas do setor.

Visando oferecer alternativas não-invasivas para a determinação do FPS de protetores solares, serão descritos procedimentos de preparo de um dispositivo fotoquímico nanoestruturado e sua aplicação no desenvolvimento de metodologias *in vitro* para a determinação do FPS de protetores solares. Todas as amostras utilizadas no desenvolvimento das metodologias foram previamente avaliadas em estudos clínicos para a determinação do Fator de Proteção Solar. Os resultados obtidos *in vitro* apresentaram boa correlação com os resultados *in vivo*, demonstrando que os dispositivos apresentam grande potencialidade e viabilidade para aprimoramento e construção de um equipamento capaz de reduzir ou até substituir os ensaios clínicos *in vivo* atualmente exigidos e praticados.

Palavras chave: Fotoquímica, Dosimetria UV, Nanodispositivos, Fator de Proteção Solar, Protetor Solar, Fotoproteção.

Abstract

Paula, Leonardo R. In vitro determination of the Sun Protection Factor of cosmetic formulations using nanostructured photochemical devices. 124 pg. Masters Thesis – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The determination of the Sun Protection Factor (SPF) of sunscreen formulations is currently a regulatory requirement in most countries and economic blocs in the world.

Strict methodologies are adopted to determine the SPF, based on the UV irradiation of human volunteers in order to induce an erythemal response in the presence and absence of sunscreen applied to the skin. Some non-invasive *in vitro* test methods can be found in the scientific literature but, so far, none of them have been accepted by the international community as a standard for determination of the Sun Protection Factor. Therefore, the development of *in vitro* methods for determination of the SPF, exhibiting good correlation with the *in vivo* methods, is of enormous interest for researchers and companies.

Thus, a non-invasive alternative for *in vitro* determination of the SPF of sunscreens, based on nanostructured photochemical devices, is described. The accuracy and reprodutibility of the new methodology were verified using clinicaly evaluated samples and correlating the *in vitro* with the *in vivo* Sun Protection Factors data. The *in vitro* results showed good correlation with *in vivo* results, demonstrating that UV-dosimeters are suitable for FPS measurements, having great potentiality for the development of equipments that would reduce or even replace the *in vivo* clinical trials currently in use.

Keywords: Photochemistry, UV dosimetry, Nanodevices, Sun Protection Factor, Sunscreen, Photoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atenuação das radiações incidentes sobre a superfície terrestre. 22

Figura 2 – Categorias dos Índices Ultravioleta. 25

Figura 3 – Tempos máximos de exposição solar em função de IUV.....25

Figura 4 - Ilustração das diferentes camadas da pele humana e seus diversos apêndices. 27

Figura 5 – Molécula do ácido *p*-aminobenzóico (PABA). 35

Figura 6 - Diagrama simplificado de Jablonski indicando as energias associadas com os estados fundamental e o excitado de menor energia. As linhas onduladas representam as relaxações vibracionais mais comuns, que também ocorrem no caso dos filtros UV. Adaptado de Kimbrough.....36

Figura 7 - Categorização da cor da pele através do cálculo do ângulo tipológico individual (ITA^{o}). Fonte: Colipa[75]. 44

Figura 8 – Gráfico preditivo de Dose Mínima Eritematosa versus Ângulo Tipológico Individual (ITA^{o}). Fonte: Colipa[75]. 48

Figura 9 – A) Espectro de ação eritematosa e B) Irradiância solar espectral esperada em 40^{o}N. 53

Figura 10 – Visualização esquemática da interação da luz com dois diferentes materiais. (**a**) meio A e meio B não difusos; (**b**) meio A difuso em seu volume e meio B não-difuso; (**c**) meio A difuso em seu volume e meio B difuso na superfície; (**d**) meio A difuso em seu volume e meio B difuso em seu volume. A=protetor solar, B=substrato. Adaptado de Garoli. 54

Figura 11 – Geometria otimizada do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$.....65

Figura 12 – (**A**) Espectro ESI-MS do complexo solubilizado em metanol com destaque em vermelho para a expansão do padrão isotópico centrado em m/z 415,9 e (**B**) Espectro teórico para $(C_{42}H_{26}N_6Br_2Fe)^{2+}$ calculado através do software mMass 3.8.0. 66

Figura 13 – Espectro eletrônico do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ a 15,0 x 10^{-6} mol.L^{-1} em metanol. Sendo: TIL = transição interna do ligante, TCL = transição de campo ligante do íon metálico e TCML = transição de transferência de carga metal-ligante. 67

Figura 14 – Deconvolução do espectro eletrônico do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ em metanol. 68

Figura 15 – Procedimento esquemático do processo de preparação dos filmes mesoporosos de TiO_2. 70

Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura de filmes mesoporosos de TiO_2 (Degussa P25) tratados termicamente a 100 ºC (A) e a 450 ºC por 30 minutos (B). Ampliação de 100.000 vezes. 70

Figura 17 – Estruturas moleculares da (a) α-CD, (b) β-CD e (c) γ-CD. A ligação glicosídica α-1,4 é mostrada em (d). 72

Figura 18 – Estrutura da carboxi-metil-β-ciclodextrina (CMβCD). 73

Figura 19 - Espectros FT-Raman da CMβCD pura, do filme de TiO_2 nanocristalino puro e do filme de TiO_2 nanocristalino modificado com CMβCD (λ_o = 532 nm). Os três espectros estão na mesma escala de intensidade Raman. 74

Figura 20 – Representação esquemática da estrutura do nanomaterial supramolecular formado pelo complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ e a CMβCD ancorada a superfície do TiO_2 nanocristalino. 75

Figura 21 – Foto dos filmes de TiO_2 não modificado (A) e modificado com CMβCD (B) após imersão em solução metanólica 20 x 10^{-3} mol.L^{-1} do complexo [Fe(Br-ph-terpy)$_2$]$(PF_6)_2$ por um período de 12 horas. 76

Figura 22 – Espectro FT-Raman do filme de TiO_2 (λ_o = 532nm). 77

Figura 23 – Espectro FT-Raman da CMβCD pura (λ_o = 532nm).....78

Figura 24 – Espectro FT-Raman do filme de TiO_2 modificado com CMβCD (λ_o = 532nm) 79

Figura 25 – Espectro FT-Raman do complexo [Fe(Br-ph-terpy)$_2$]$(PF_6)_2$ puro (λ_o = 532nm) 80

Figura 26 – Espectro FT-Raman do dosímetro UV (λ_o = 532nm).....81

Figura 27 – Espectro Raman para: (**A**) TiO_2 puro, (**B**) CMβCD pura, (**C**) TiO_2 modificado com CMβCD, (**D**) composto [Fe(Br-ph-terpy)$_2$]$(PF_6)_2$ puro, (**E**) dosímetro UV resultante da interação hóspede-hospedeiro. 82

Figura 28 – **A**) Curva cinética mostrando a fotodegradação do dispositivo UV ao ar (■); e **B**) gráfico de ln (A/Ao) em função do tempo de irradiação ao ar (■), em atmosfera de nitrogênio (▼) e em atmosfera de ar e irradiação apenas com luz visível (o). Absorbâncias monitoradas no comprimento de onda de 572 nm. 83

Figura 29 – Foto do simulador solar Multiport 601 com a disposição das saídas de luz em destaque. 87

Figura 30 - Esquema mostrando um par de matrizes 3 x 2 de dosímetros UV para medida de FPS antes (esquerda) e após (direita) a incorporação do complexo. A área dos quadrados é maior que 1 cm^2 de modo que os feixes das saídas do simulador solar estejam circunscritos dentro dos mesmos. 89

Figura 31 – Substrato – VitroSkin® de IMS. Inc. À direita o destaque da demarcação das áreas de aplicação de produtos no formato de uma matriz 3 x 2 coincidente com o posicionamento dos dosímetros e das saídas de luz do simulador solar. 90
Figura 32 – Foto mostrando a montagem utilizada nos ensaios (esquerda), e a matriz de dosímetros antes e após a irradiação UV com doses crescentes nas saídas de luz de 1 a 6. 92
Figura 33 – Gráfico da correspondência entre os valores de FPS determinados *in vivo* e *in vitro* por avaliação visual dos DMBs.....95
Figura 34 - Simulador solar Multiport 16S-150 utilizado nos ensaios. 98
Figura 35 – Substrato VitroSkin® cortado em disco de 2 cm^2 e fixado em suporte metálico para aplicação da amostra de protetor solar. 99
Figura 36 – Esquema mostrando o arranjo experimental utilizado para a determinação do FPS através de medidas espectrofotométricas. 100
Figura 37– Exemplo da variação espectral do dosímetro UV coberto com VitroSkin® não-protegida em função do tempo de exposição UV. 101
Figura 38 – Curvas cinéticas do processo de descoloramento inicial dos dosímetros UV de TiO_2 nanocristalino: A) sem protetor solar, e com protetores solares com FPS iguais a B) 9, C) 15, D) 30, E) 50 e F) 60. As retas correspondem às regressões lineares. 102
Figura 39 – Gráfico das constantes de velocidade iniciais de branqueamento/descoramento em função dos valores de FPS *in vivo* (eixo da esquerda, quadrados em azul). Gráfico do recíproco das constantes de velocidade em função dos valores de FPS *in vivo* (eixo da direita, circulos em preto).....106

Figura 40 – Gráfico do recíproco das constantes de velocidade em função dos valores de FPS *in vivo*. Comparativo de resultados obtidos por dois analistas independentes. 107
Figura 41 – (**A**) Gráfico de barras com os valores Reais e Previstos do FPS obtidos em um estudo cego. (**B**) Gráfico da correspondência de valores Reais *versus* Previstos do FPS obtidos em um estudo cego, demonstrando a linearidade entre os mesmos. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos fototipos de pele conforme Fitzpatrick. 28

Tabela 2 - Estrutura e exemplos das substâncias absorvedoras de radiação UV utilizadas em protetores solares[53]. 37

Tabela 3 – Evolução cronológica dos métodos de determinação do FPS *in vivo*. 41

Tabela 4 - Categorias de cor da pele em função do ITA^{o} (Fonte: Colipa 2004). 43

Tabela 5 - FPS e limites de aceitação para os Protetores Solares de referência.....45

Tabela 6 - Limites de %RCEE definidos pelo International Sun Protection Factor Test Method (2006). 88

Tabela 7 – Dados de FPS *in vivo*, DMB e FPS *in vitro* determinados para uma série de amostras de protetores solares. 94

Tabela 8 - Dados de FPS *in vivo* e Velocidades de branqueamento/descoramento (monitoramento da absorbância em 572 nm) determinados para uma série de amostras de protetores solares. 105

Tabela 9 - Dados de Velocidades de branqueamento (Absorbância em 572 nm) e previsão do FPS *in vivo* determinados em um estudo cego. 109

LISTA DE ABREVIATURAS*

J – Joule

W – Watt

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

FPS – Fator de Proteção Solar

DEM – Dose Eritematosa Mínima

DMB – Dose Mínima de Branqueamento

ITA^{o} – Ângulo Tipológico Individual

FDA – Food and Drug Administration

COLIPA – Comité de Liason des Associations Européenes de Insdustrie et la Perfumerie

CMβCD – Carboxi-metil-β-ciclodextrina

Br-ph-Terpy – Bromo-Fenil-Terpiridina

* As abreviaturas estão de acordo com a maneira como são encontradas na literatura e nem sempre são traduzidas para não criar ambiguidades nas interpretações.

SUMÁRIO

RESUMO **7**

ABSTRACT **8**

LISTA DE FIGURAS **9**

LISTA DE TABELAS **14**

LISTA DE ABREVIATURAS **15**

1 APRESENTAÇÃO **19**

1.1 INTRODUÇÃO 20

1.2 A LUZ SOLAR 21

1.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE 26

1.4 OS FOTOTIPOS DE PELE 27

1.5 EFEITOS NOCIVOS DA RADIAÇÃO UV SOBRE A PELE 28

1.5.1 Efeitos Agudos *29*

1.5.1.1 Eritema 29

1.5.1.2 Bronzeamento 30

1.5.1.2.1 Bronzeamento Imediato 30

1.5.1.2.2 Bronzeamento Tardio 30

1.5.2 Efeitos Crônicos *31*

1.5.2.1 Fotoenvelhecimento 31

1.5.2.2 Supressão Imunológica 31

1.5.2.3 Câncer de Pele 32

1.6 PROTETORES SOLARES 33

1.7 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO SOLAR 37

1.8 O FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) 38

1.8.1 Metodologias in vivo para determinação do FPS *39*

1.8.1.1 Método *International SPF Test Method* 2006 42

1.8.1.1.1 Seleção dos voluntários 42

1.8.1.1.2 Área de teste....45
1.8.1.1.3 Fonte de radiação ultravioleta....45
1.8.1.1.4 Protetor Solar de referência....45
1.8.1.1.5 Quantidade e aplicação dos produtos....46
1.8.1.1.6 Exposições UV....47
1.8.1.1.7 Procedimento para determinação da Dose Eritematosa Mínima (DEM)....49
1.8.1.1.8 Cálculo do Fator de Proteção Solar e critérios estatísticos....50
1.8.2 Metodologias in vitro para determinação do FPS....51

2 OBJETIVOS....56

3 PARTE EXPERIMENTAL....57

3.1 MATERIAIS E REAGENTES....58
3.2 ANÁLISE ELEMENTAR....59
3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS....59
3.4 ESPECTROS ELETRÔNICOS....59
3.5 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL....59
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA....60
3.7 SISTEMA PARA ESTUDOS DE FOTODEGRADAÇÃO....60
3.8 SISTEMA PARA DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO*....60

4 CONSTRUÇÃO DO DOSÍMETRO UV....61

4.1 INTRODUÇÃO....62
4.2 ESTRATÉGIA SUPRAMOLECULAR PARA CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO UV....62
4.3 SÍNTESE DO COMPOSTO $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$....64
4.3.1 Caracterização do composto $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$....64
4.3.1.1 Geometria do complexo....64
4.3.1.2 Análise Elementar....65
4.3.1.3 Espectrometria de Massa....65
4.3.1.4 Espectroscopia Eletrônica....67
4.4 CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO UV....69
4.4.1 Preparação de filmes mesoporosos de TiO_2....69
4.4.1.1 Caracterização dos filmes de TiO_2 por MEV....70

4.4.2 Funcionalização dos filmes de TiO_2 c/ ciclodextrina.....71

4.4.2.1 Funcionalização dos filmes mesoporosos de TiO_2.....73

4.4.3 Adsorção do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ nos filmes funcionalizados de TiO_2.....75

4.4.3.1 Caracterização do dispositivo por Espectroscopia Raman.....76

4.4.4 Estudo de fotodegradação do dispositivo UV.....82

5 METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DO FPS DE PREPARAÇÕES COSMÉTICAS 85

5.1 MÉTODO #1 - FPS *IN VITRO* ATRAVÉS DE AVALIAÇÃO VISUAL 86

5.1.1 Simulador Solar 87

5.1.2 Confecção dos Dosímetros UV 88

5.1.3 Substrato 89

5.1.4 Modo de Aplicação da Amostra Sobre o Substrato.....90

5.1.5 Dosímetro/Substrato/Amostra para Medida de DMB.....90

5.1.6 Determinação in vitro do FPS de Protetores Solares 93

5.2 MÉTODO #2 - FPS *IN VITRO* ATRAVÉS DE AVALIAÇÃO INSTRUMENTAL 96

5.2.1 Simulador Solar 97

5.2.2 Substrato e aplicação das amostras.....98

5.2.3 Monitoramento Instrumental.....99

5.2.4 Determinação in vitro do FPS por medida instrumental 101

6 PERSPECTIVAS FUTURAS..... 111

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 113

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 114

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Introdução

A comprovação da eficácia de protetores solares é de grande importância, sendo uma questão de saúde pública na medida em que a radiação solar é a grande contribuidora para os casos de queimaduras de pele, imunossupressão e câncer de pele. Atualmente a determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas é realizada por meio de metodologias validadas e reconhecidas internacionalmente, sendo os principais exemplos a regulamentação do *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos e o *International Sun Protection Factor Test Method* reconhecido pela Comunidade Européia, Japão, CTFA-África do Sul e CTFA-Estados Unidos. Tais metodologias são baseadas em avaliações clínicas, mais especificamente na irradiação ultravioleta de voluntários humanos em seus procedimentos.

Em função dos altos custos, tempo de execução demasiadamente longo e características invasivas destas metodologias *in vivo*, diversas metodologias *in vitro* para a determinação do Fator de Proteção Solar tem sido propostas nas últimas décadas. Tais metodologias *in vitro* apresentam deficiências que ainda não foram superadas a fim de se obter reconhecimento e aprovação internacional para a substituição dos métodos *in vivo*.

Portanto, é de grande interesse por parte da indústria cosmética e farmacêutica, e por parte dos órgãos governamentais, o estabelecimento de metodologias não invasivas confiáveis para a determinação do Fator de Proteção Solar de protetores solares.

1.2 A Luz Solar

Há mais de 400 anos atrás, Nicolau Copérnico declarou que o Sol era o centro do universo. Ao longo da história, a humanidade teve uma relação especial com o Sol. Do Egito ao México, o rei Sol era adorado, era considerado o Deus que dava calor e permitia o crescimento das lavouras. Na verdade, não há nenhuma região do mundo que não seja influenciada pelo Sol. Da fotossíntese até o nosso humor, estão condicionados pelo Sol[1]. Não é de admirar, então, o papel central da radiação solar em nossas vidas. No entanto, nem todos os aspectos desta radiação são positivos, pois, como será visto, há efeitos deletérios causados pela natureza intrínseca da radiação solar.

O Sol emite diversos tipos de radiações: radiações ionizantes, radiações ultravioleta, luz visível, radiações infravermelhas, etc. Todavia, o campo magnético e a atmosfera da Terra filtram as radiações de maior energia, de modo que o espectro solar na superfície terrestre é formado por radiações com comprimentos de onda compreendidos entre 290 e 3000 nm. Devido ao fato de abranger esta faixa relativamente grande de energias, do ponto de vista da prática clínica, o espectro solar considerado é formado pelas radiações ultravioleta (290 a 400 nm), luz visível (400 a 760 nm) e radiação infravermelha (760 a 3000 nm)[2,3,4,5].

A proporção, em energia, de cada uma dessas faixas de radiação é a seguinte:

- 40% luz visível
- 50% radiação infravermelha
- 10% radiação ultravioleta (1% UVB + 9% UVA)

Embora o Sol emita radiações de comprimentos de onda menores que 290 nm, estas não chegam à superfície terrestre (e por consequência à pele) devido à absorção

seletiva que sofrem pela camada de ozônio e oxigênio molecular presentes na estratosfera[6] (Figura 1).

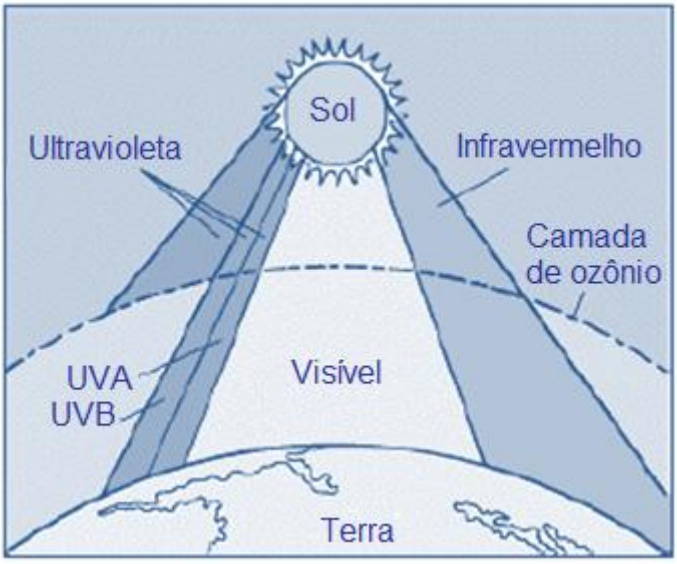


Figura 1 - Atenuação das radiações incidentes sobre a superfície terrestre.

Portanto, existe uma radiação incidente de energia muito elevada que é atenuada pelos componentes da estratosfera, fazendo com que a energia que recebemos seja menor que a inicial (no espaço, fora da atmosfera terrestre).

A maioria dos efeitos prejudiciais à saúde, principalmente sobre a pele e os olhos, é causada pela ação da radiação ultravioleta. A radiação infravermelha e a luz visível geralmente são inócuas para os seres humanos[7].

Por convenção, o espectro ultravioleta se subdivide arbitrariamente em três faixas de maior a menores comprimentos de onda, denominadas UVA, UVB e UVC, respectivamente.

A faixa UVA é compreendida pelos fótons de comprimentos de onda entre 400 a 320 nm. Este espectro é responsável pela reação de pigmentação da pele e por vários outros efeitos como o fotoenvelhecimento e a fotossensibilização[8].

A faixa UVB é compreendida pelos fótons de comprimentos de onda entre 320 a 290 nm. Possui também uma ação de pigmentação, mas é marcadamente reconhecida

como a região responsável pelas queimaduras solares (eritemas), além da contribuição para o câncer de pele.

A faixa UVC é compreendida pelos fótons de comprimentos de onda menores que 290nm (290 a 100nm)[9]. Esta faixa de radiação UV é extremamente eritematógena, mutagênica e carcinogênica, mas praticamente não alcança a superfície terrestre devido à atenuação produzida pela camada de ozônio presente na estratosfera.

Existe uma crescente preocupação sobre as radiações UVC e UVB já que devido à contínua degradação da camada de ozônio da estratosfera pelos clorofluorcarbonetos (CFCs), se prevê um aumento nos níveis de radiação desta faixa do espectro sobre a superfície terrestre e, por consequência, os efeitos nocivos que estas radiações podem produzir sobre a saúde das pessoas[10].

Além da caracterização do espectro solar, é importante destacar os fatores que influenciam a sua incidência na superfície terrestre e a quantidade de energia recebida durante uma exposição solar. A altitude em que a exposição solar ocorre exerce considerável influência na incidência da radiação UV. Quando medida a partir do nível do mar, a radiação UV aumenta em 4% a cada 300 metros de incremento na altitude[11]. A composição da superfície terrestre também exerce influência nos níveis de radiação UV a que estamos expostos. Por exemplo, gelo e neve refletem o dobro da radiação UV refletida pela terra e pela grama[12]. Outro fator a ser considerado é a sazonalidade. Se considerarmos uma latitude fixa, no inverno o sol possui um ângulo maior em relação ao hemisfério, aumentando o “caminho óptico” e o grau de atenuação da radiação pela atmosfera. A própria latitude, independente da época do ano, tem grande influência na intensidade de radiação UV que chega à superfície terrestre, sendo maior no equador onde a radiação percorre uma menor distância através da atmosfera.

A quantidade de energia solar, ou dose, é medida através de espectroradiômetros e o seu cálculo é feito relacionando-se os parâmetros tempo de exposição e intensidade de radiação como monstrado na Eq. 1.

$$\text{Dose (J)} = \text{Intensidade (W)} \times \text{Tempo (s)} \qquad \text{Eq. 1}$$

Devido às preocupações relacionadas à saúde pública e buscando formas mais fáceis para se alertar a população sobre os perigos e formas de proteção contra a radiação ultravioleta, uma série de discussões centralizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), nos primeiros anos da década de 1990, culminou no estabelecimento de um índice ultravioleta (IUV) que hoje se encontra internacionalmente harmonizado.[13]

O índice UV é uma medida simples do nível de radiação ultravioleta na superfície terrestre e um indicador do seu dano potencial para a pele.[6,14,15,16,17,18,19]

Os níveis de radiação ultravioleta e, portanto os valores do índice UV, variam ao longo do dia. Por isso, o IUV para um determinado dia é calculado através da máxima intensidade UV prevista para aquele dia, que ocorre em um período de 4 horas em torno do meio dia.[20]

O cálculo do IUV leva em consideração o espectro de ação referência para a indução do eritema na pele humana (ISO 17166:1999/CIE S007/E-1998) e o seu resultado é uma quantidade adimensional definida pela fórmula representada na Eq. 2.

$$I_{\text{UV}} = \text{k}_{\text{er}} \cdot \int_{290nm}^{400nm} E_{\lambda} \cdot \text{s}_{\text{er}}(\lambda) d\lambda \qquad \text{Eq. 2}$$

onde, E_λ é a irradiância espectral expressa em $W.m^{-2}.nm^{-1}$ no comprimento de onda λ e $d\lambda$ é o intervalo de comprimento de onda utilizado na integração. $s_{er}(\lambda)$ é o espectro de ação referência para a indução do eritema na pele humana e k_{er} é uma constante com valor igual à 40 $m^2.W^{-1}$.

Os valores de IUV são agrupados em categorias conforme ilustrado na Figura 2, seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde[21].

Figura 2 – Categorias dos Índices Ultravioleta.

Kirchhoff[22], em seu livro publicado em 1995, apresenta uma correspondência entre os índices UV e o tempo máximo de exposição para se evitar queimaduras solares, dependendo logicamente dos fototipos da pele dos indivíduos.

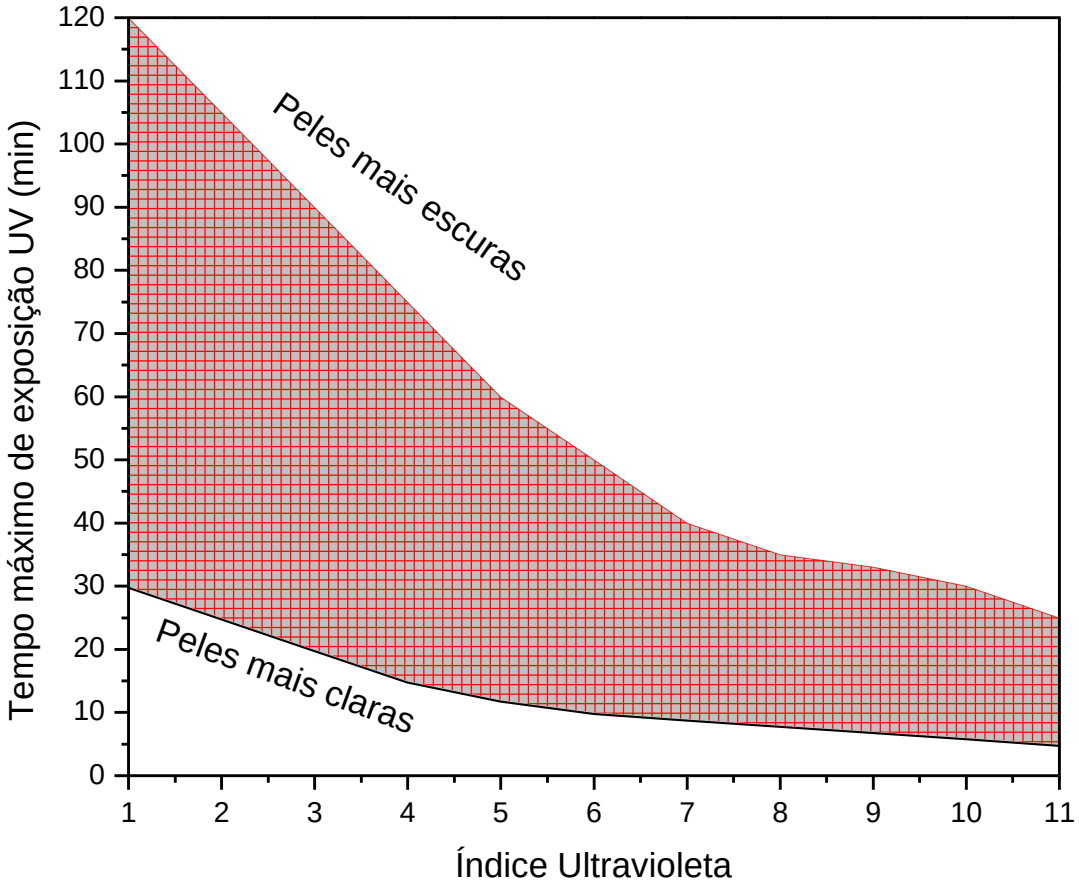


Figura 3 – Tempos máximos de exposição solar em função de IUV (adaptado de Kirchhoff, 1995).

1.3 Estrutura e Função da Pele

A pele é composta basicamente de duas camadas: a epiderme e a derme. Essas camadas da pele e seus apêndices estão representados na Figura 4.

A epiderme, que é a camada mais externa, está diretamente em contato com o meio ambiente e é composta por três tipos celulares básicos: queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans.

O queratinócito, ou célula escamosa, é a principal célula da epiderme. Tem a função de produzir a queratina, uma proteína filamentosa que possui a função protetora que produz uma subcamada conhecida como estrato córneo, além de ser a proteína estrutural dos pêlos e unhas.

O melanócito é uma célula dendrítica produtora de pigmentos (melanina) na epiderme. Em uma célula adulta normal os melanócitos se encontram na camada basal da epiderme em uma proporção aproximada de uma célula por cada dez queratinócitos basais. Independentemente da cor ou raça de um indivíduo, o número de melanócitos na epiderme é aproximadamente constante. As diferenças raciais são determinadas pelas atividades dessas células e os tipos de pigmentos (melaninas) sintetizados na epiderme. Existem basicamente duas classes principais de melanina: a eumelanina, de cor castanha ou preta, e a feomelanina, de cor avermelhada ou amarelada.

As células de Langerhans se encontram dispersas entre os queratinócitos do estrato espinhoso e desempenham o papel de células sentinelas do sistema imunológico.

A derme é a camada da pele entre a epiderme e os tecidos subcutâneos sendo composta de duas camadas: a derme papilar e a derme reticular[23]. Os

componentes estruturais da derme são o colágeno, fibras elásticas e a matriz extrafibrilar[24].

No que diz respeito à radiação ultravioleta, os estudos se concentram principalmente na epiderme que, como será visto com mais detalhes, corresponde à região da pele mais afetada pela dita radiação.

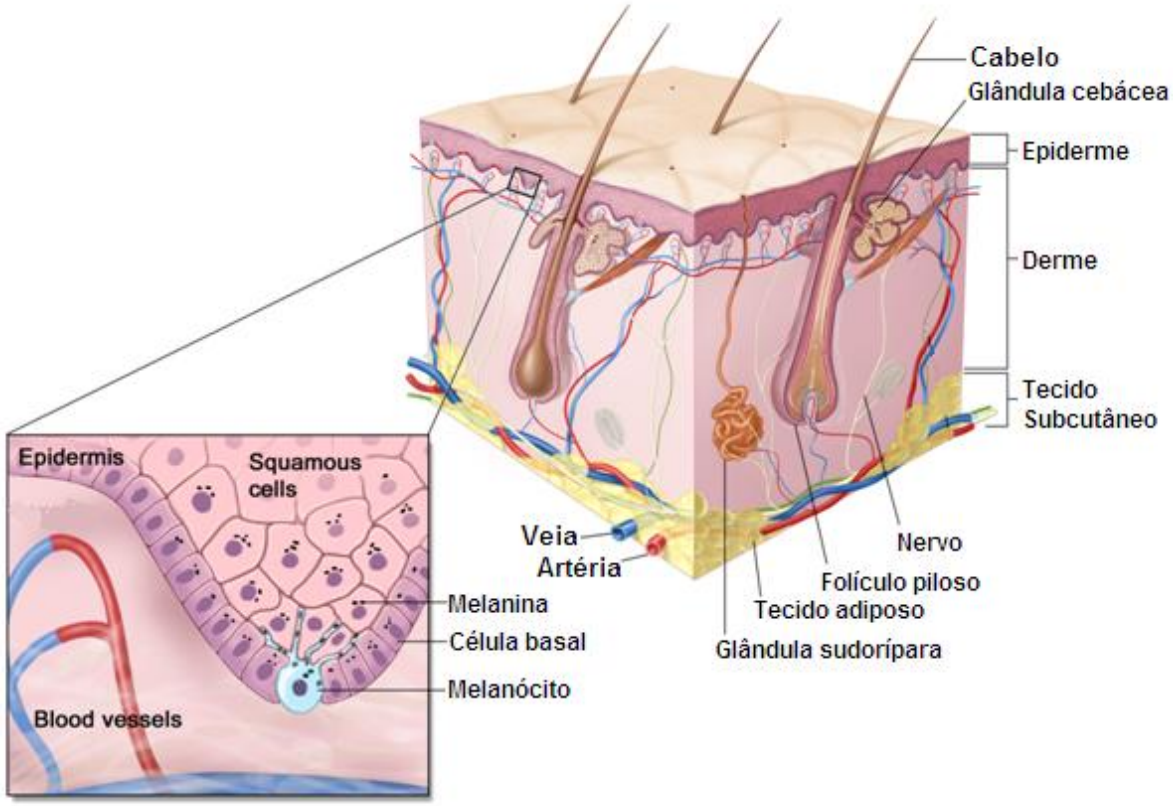


Figura 4 - Ilustração das diferentes camadas da pele humana e seus diversos apêndices[25].

1.4 Os Fototipos de Pele

A resposta da pele frente à exposição solar não é uniforme em todos os indivíduos e raças. Isso levou Fitzpatrick[26] a propor a classificação dos indivíduos segundo os fototipos cutâneos, estabelecidos através da medida da suscetibilidade da pele em sofrer dano após a exposição solar. A classificação contempla seis tipos de pele com numeração de 1 a 6 conforme a Tabela 1. Os números mais baixos

correspondem a pessoas de pele mais clara e os números mais altos a pessoas de pele mais escura e, portanto, com maior proteção contra a radiação ultravioleta[27].

Tabela 1 – Classificação dos fototipos de pele conforme Fitzpatrick.

Fototipo	I	II	III	IV	V	VI
Pele	Branca	Branca	Branca	Morena	Morena	Negra
Queimaduras	Intensas	Facilmente	Moderadas	Pouco	Raramente	Nunca
Bronzeado	Nunca	Dificilmente	Leve	Fácil	Fácil e intenso	Intenso
Tempo de proteção natural	5-10min	10-20min	20-30min	~ 45min	~ 60min	~ 90min

1.5 Efeitos Nocivos da Radiação UV Sobre a Pele

A partir de 1920, iniciou-se uma mudança no estilo de vida e nos padrões estéticos das pessoas, onde o tempo que passamos ao ar livre aumentou consideravelmente, concomitantemente com a exposição de nossa pele à radiação solar. A exposição a pequenas doses de radiação solar trás benefícios para o organismo uma vez que contribui para o desenvolvimento dos ossos, produção de vitaminas, etc. Mas uma exposição prolongada eleva o risco de dano permanente à pele. A radiação ultravioleta é o único fator com comprovada relação direta com o câncer de pele, além de provocar outros problemas à saúde como, por exemplo, as

queimaduras solares (eritemas), imunossupressão, cataratas, envelhecimento precoce da pele, etc.[28,29].

1.5.1 Efeitos Agudos

1.5.1.1 Eritema

O eritema solar ou "queimadura solar" é uma inflamação aguda da pele formada após uma exposição excessiva à radiação solar. Os raios UV (principalmente UVB) afetam as células superficiais da pele e pequenos vasos sanguíneos subjacentes. Isso resulta no aparecimento de vermelhidão, por vezes, pontilhada de bolhas.

Essa condição ocorre quando a radiação UV incidente excede a capacidade de proteção da melanina da pele. A dose de radiação UV necessária para se provocar um mínimo sinal de vermelhidão na pele (eritema), conhecida por Dose Eritematosa Mínima (DEM)[30], é a base para o cálculo do Fator de Proteção Solar de protetores solares.

As concentrações e proporções das espécies de melaninas variam bastante entre as pessoas, mas em geral, pessoas de pele escura têm maior proporção de eumelanina do que aquelas de pele mais clara. Por ela ter alto poder de dissipação da radiação UV, a incidência de queimadura solar entre indivíduos de pele escura é menor.

Após uma exposição UV mínima, que varia de pessoa para pessoa, a pele pode se tornar vermelha dentro de um período de 2 a 6 horas[31]. A dor geralmente é mais forte 6 a 48 horas após a exposição. A queimadura continua a se desenvolver por 24 a 72 horas ocasionalmente seguida por uma escamação da pele em 3 a 8 dias. Escamação e coceira podem continuar a ocorrer durante várias semanas.

1.5.1.2 Bronzeamento

Dois tipos distintos de bronzeamento da pele ocorrem em resposta à exposição ultravioleta. O bronzeamento imediato (*immediate pigment darkening*, IPD) e o bronzeamento tardio (*delayed tanning*, DT).

1.5.1.2.1 Bronzeamento Imediato

O bronzeamento imediato da pele é induzido principalmente pelo UVA e certos comprimentos de onda da luz visível. Esta reação começa durante a exposição e atinge o seu máximo no final do período de irradiação. Este bronzeamento pode desaparecer dentro de poucos minutos se o tempo de exposição for curto, ou pode durar de 3 a 6 horas após uma exposição prolongada aos raios UVA. Durante esta reação, não há formação de melanina nova ou um aumento na transferência de melanossomas nos queratinócitos[32]. Isso pode explicar a baixa capacidade de proteção desse tipo de bronzeamento.

1.5.1.2.2 Bronzeamento Tardio

O bronzeamento tardio aparece entre 48 e 72 horas após a exposição à radiação UV. A pigmentação atinge o seu máximo 7 a 10 dias após a exposição e pode durar várias semanas. Esse tipo de bronzeamento é causado principalmente pela ação dos raios UVB que estimulam a produção de novas moléculas de melanina pelos melanócitos. Radiação UVA também tem sido associada com o mecanismo de bronzeamento tardio, mas nas condições reais de exposição as

doses de radiação UVA nunca são altas o suficiente para estimular a formação de novas moléculas de melanina[33].

O pigmento obtido pela produção de melanina fornece certo grau de proteção contra o eritema ou queimadura solar, que varia conforme o tipo de pele do indivíduo[34]. Para a maioria das pessoas, o bronzeamento representa uma reação normal de defesa da pele quando exposta aos raios solares. No entanto, obter uma pele pigmentada envolve danos ao DNA e outras células[35], que em longo prazo podem causar efeitos nocivos a saúde.

1.5.2 Efeitos Crônicos

1.5.2.1 Fotoenvelhecimento

O fotoenvelhecimento (ou dermatoeliose) é uma forma acelerada de envelhecimento e é causada principalmente pela exposição crônica à radiação UVA. Exposições frequentes e prolongadas a diferentes fontes de radiação ultravioleta (sol, câmaras bronzeadoras) aceleram o aparecimento dos sinais de envelhecimento. De fato, clinicamente a pele fotoenvelhecida apresenta sinais bem característicos como a aparência de rugas finas e grossas, elastose dérmica e pigmentação irregular da pele[36].

1.5.2.2 Supressão Imunológica

Quando o sistema imunológico de uma pessoa já não é capaz de proteger o organismo contra agentes externos, fala-se de imunossupressão. Muitos estudos experimentais mostram que a radiação UV, especialmente UVB, tem um efeito supressor sobre o sistema imunológico humano[37]. E a ineficácia do sistema

imunológico desempenha um papel importante na promoção foto-induzida de cânceres de pele[37]. Células com DNA danificado (e portanto potencialmente cancerosas) podem escapar à vigilância do sistema imunológico e se dividirem de forma descontrolada, levando ao desenvolvimento de câncer pele[28].

1.5.2.3 Câncer de Pele

São três os principais tipos de câncer de pele: o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma.

O carcinoma basocelular é o câncer de pele mais comum. As células da camada basal da epiderme são alteradas de modo a não poderem produzir a queratina. É um tipo de câncer com baixa incidência de mortalidade, já que raramente sofre metástase. Porém, apresenta elevado poder de destruição localizado, causando problemas estéticos e funcionais aos doentes. Esse tipo de câncer ocorre geralmente em áreas muito expostas ao sol como o rosto, braços e pescoço[38].

O carcinoma espinocelular é um tumor maligno da pele, representando cerca de 20 a 25% dos cânceres de pele, e tem um crescimento mais rápido que o carcinoma basocelular. Pode enviar metástases para outros órgãos se não for tratado precocemente. Também são localizados mais frequentemente nas áreas de pele expostas continuamente à radiação solar[38].

O melanoma é um câncer dos melanócitos. Ele representa apenas 4% dos cânceres de pele, mas a sua incidência está aumentando rapidamente e sua letalidade é alta[39]. Uma superexposição à radiação UV até os 15 anos de idade acompanhada de queimaduras severas é a principal causa do surgimento do melanoma em adultos de 20 a 40 anos[40].

1.6 Protetores Solares

Os protetores solares são produtos de uso tópico que possuem a capacidade de absorver e/ou refletir as radiações ultravioletas que atingem a pele, reduzindo assim seus efeitos danosos sobre a mesma[41].

O primeiro protetor solar que se tem documentado surgiu em 1928 nos Estados Unidos com a introdução comercial de uma emulsão contendo dois filtros orgânicos (cinamato de benzila e salicilato de benzila). O primeiro filtro solar patenteado foi o ácido para-aminobenzóico (PABA), em 1943, que se popularizou na década de 1960 levando ao posterior desenvolvimento de diversos derivados PABA em protetores solares. Na década de 1980, observou-se uma inflexão no que diz respeito ao uso de filtros solares em produtos para cuidados com a pele[42]. Hoje em dia é grande o número de moléculas com propriedades fotoprotetoras aprovadas para uso em protetores solares.

No Brasil a lista regulatória vigente descreve os 38 diferentes filtros ultravioletas permitidos para uso cosmético, bem como suas concentrações máximas de aplicação (Resolução RDC n. 47, de 16 de março de 2006)[43].

Com relação à prototipagem de novos produtos, é fundamental que os filtros solares sejam compatíveis com os inúmeros outros ingredientes presentes em uma formulação. Além disso, devem ser estáveis conservando suas propriedades mesmo quando expostos à luz, e não devem apresentar reações adversas quando em contato com a pele[44].

Os filtros solares são classificados segundo sua natureza e propriedades físico-químicas. São eles:

Filtros Solares Inorgânicos – Também chamados de filtros físicos, são comumente descritos como agentes de reflexão e dispersão da radiação UV[45]. Por não serem comprimento de onda-seletivos, os filtros inorgânicos são reconhecidos como ingredientes muito efetivos para aplicação em protetores solares já que contribuem para uma proteção de amplo espectro[46].

Os materiais mais comuns para aplicação em proteção solar são o dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO). Logo, os mecanismos de reflexão/dispersão da radiação UV não são os únicos existentes. Por serem materiais semicondutores, pode-se também atribuir mecanismos de absorção e de desativação que envolvem transições eletrônicas entre as bandas de valência e de condução naqueles óxidos.

A quantidade de energia necessária para a promoção de elétrons da banda de valência para a banda de condução do TiO_2 na fase cristalina rutilo é de 3,1 eV, e de 3,2 eV no caso do ZnO [47]. Pela teoria quântica é possível calcular o comprimento de onda mínimo da radiação, ou seja, a energia mínima necessária para se promover as transições eletrônicas descritas acima (Eq. 3).

$$\lambda = \frac{h.C}{E} \qquad \text{Eq. 3}$$

Onde λ é o comprimento de onda, *h* é a constante de Plank, *c* é a velocidade da luz e *E* é a diferença de energia entre dois estados eletrônicos em moléculas, ou a diferença de energia entre o topo da banda de valência e o fundo da banda de condução (*band gap*) em semicondutores.

Utilizando a Equação 3 obtém-se os comprimentos de onda de 404 nm e 384 nm para o TiO_2 e ZnO, respectivamente. Comprimentos de onda inferiores a estes (radiações mais energéticas) são passíveis de serem absorvidos por esses óxidos. Já as radiações menos energéticas serão atenuadas por espalhamento.

A utilização daqueles materiais na forma de nanoparticulas é uma inovação recente que tem aumentado a eficácia dos protetores solares, além de possibilitarem a formação de filmes mais transparentes sobre a pele[48,49]. Atualmente já existe um maior consenso de que é seguro o uso de nanopartículas em protetores solares. De fato, vários estudos foram realizados demonstrando que não há permeação cutânea significativa destes nanomateriais[50]. Assim, as possibilidades de toxicidade aguda ou sistêmica devido a absorção e distribuição dos mesmos pelo organismo tendem a ser pouco significativas.

Filtros Solares Orgânicos – Também chamados de filtros químicos, são moléculas orgânicas que apresentam intensas bandas de absorção na região do UV. Possuem uma classificação baseada no tipo de radiação que absorvem: a) filtros UVA, se absorverem a radiação em comprimentos de onda compreendidos entre 320 e 400 nm e b) filtros UVB, se absorverem a radiação em comprimentos de onda compreendidos entre 290 e 320 nm[42,51].

Geralmente, os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados substituídos com grupamentos carbonila, que podem apresentar grupos doadores de elétron (grupamentos metoxi ou amina) nas posições *orto* ou *para* do anel aromático[49]. Um bom exemplo para ilustração é a molécula do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) que possui um grupo ácido carboxílico e um grupo amino em posições *para* no anel benzênico (Figura 5).

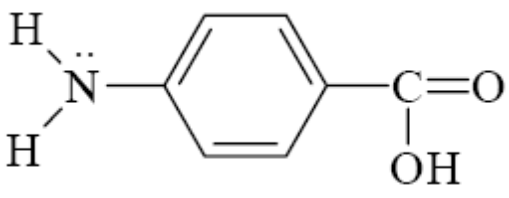


Figura 5 – Molécula do ácido *p*-aminobenzóico (PABA).

O mecanismo de proteção envolve a absorção da radiação UV, promovendo um dos elétrons do orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) da molécula no estado fundamental para o orbital π* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia). Então, as moléculas no estado excitado retornam para o estado inicial liberando o excesso de energia na forma de calor, uma forma de energia não danosa para a pele. Aquelas transições eletrônicas ocorrem quando a energia dos fótons, no caso da luz UV, corresponde a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado de menor energia (transição envolvendo os orbitais HOMO e LUMO)[52]. Na Figura 6 é apresentado um diagrama de Jablonski, ou seja, um esquema mostrando os mecanismos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem após o processo de fotoexcitação, e que também explicam a ação dos filtros solares orgânicos. Na tabela 2 estão relacionados alguns dos filtros solares mais utilizados para a formulação de protetores solares.

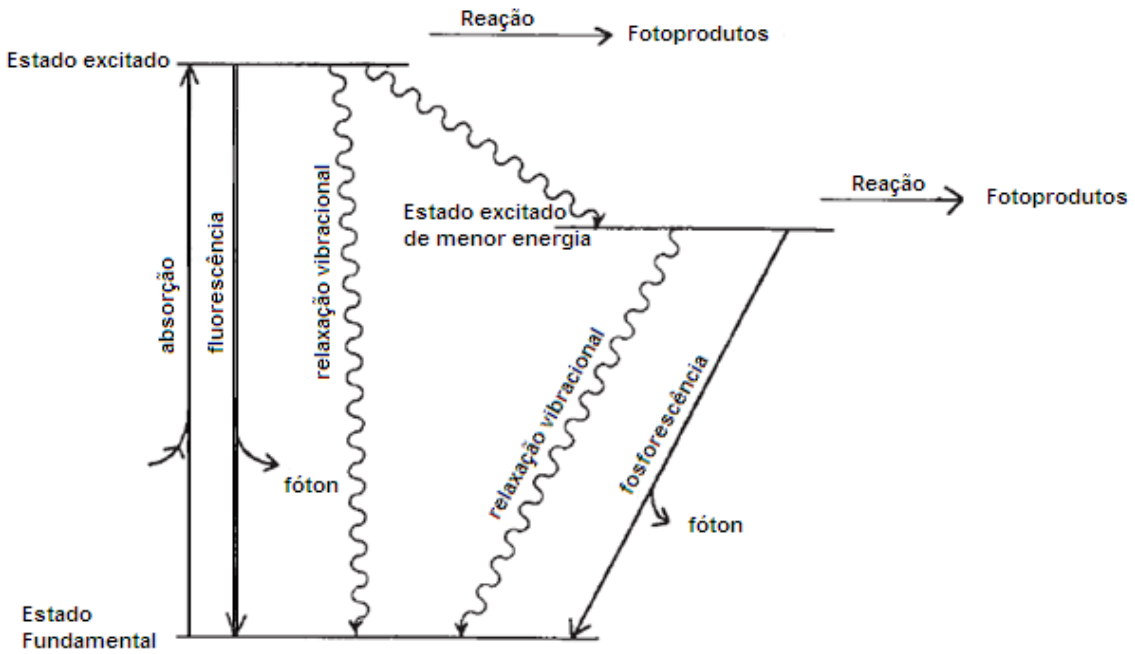
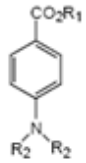
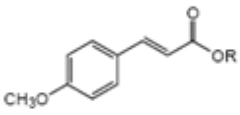
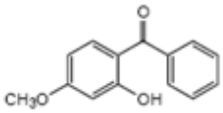
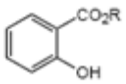
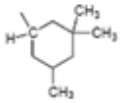
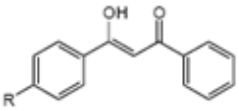


Figura 6 - Diagrama simplificado de Jablonski indicando as energias associadas com os estados fundamental e o excitado de menor energia. As linhas onduladas representam as relaxações vibracionais mais comuns, que também ocorrem no caso dos filtros UV. Adaptado de Kimbrough[53].

Tabela 2 - Estrutura e exemplos das substâncias absorvedoras de radiação UV utilizadas em protetores solares[53].

Categoria	Estrutura	Exemplos	Absorção UV λ max(nm)
Derivados PABA		PABA $R_1 = R_2 = H$	283–289
		2-ethylhexyl-*p*-dimethylaminobenzoate (Padimate O) $R_1 = -CH_2CH(C_2H_5)-C_4H_9$ $R_2 = -CH_3$	310
Cinamatos		2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate (Parsol® MCX, Neo-Heliopan AV) $R = -CH_2CH(C_2H_5)-C_4H_9$	310
		2-ethoxyethyl-*p*-methoxycinnamate (Giv Tan F) $R = -C_2H_4-O-C_2H_5$	310
Oxibenzona		(2-hydroxy-4-methoxy)-benzophenone oxybenzone	288–290 325
Salicilatos		Homomenthyl salicylate (homosalate, Heliophan) R = 	309
		Octyl salicylate $R = -C_8H_{17}$	310
Dibenzoilmetanos		Avobenzone (Parsol® 1789) $R = -C(CH_3)_3$	358
		4-isopropyldibenzoylmethane (Eusolex® 8020) $R = -CH(CH_3)_2$	315

1.7 Avaliação da Proteção Solar

O potencial fotoprotetor de preparações cosméticas pode ser avaliado de diferentes formas. Na literatura científica temos descrições de procedimentos para avaliação de danos ao DNA devido à radiação UV e consequente redução dos danos devido ao uso de protetores solares[54]. Formação de “sunburn cells” (SBC), alterações dos fibroblastos[54], fotocarcinogênese[55,56], fotoenvelhecimento[57,58], queratose solar[59,60], mutação do gene p53[61], etc. Apesar de ser criticado por não representar completamente os danos causados à pele, o resultado, ou seja, a formação de eritema via processo inflamatório induzido pela radiação UVB tem sido

o mais amplamente utilizado e aceito para a avaliação do nível de proteção solar de protetores solares. A formação do eritema pela radiação UVB é a base das metodologias para determinação do FPS de protetores solares e este será o foco principal do trabalho, ou seja, estudar alternativas para a substituição das avaliações *in vivo* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas.

1.8 O Fator de Proteção Solar (FPS)

O Fator de Proteção Solar (FPS) é definido[62] como sendo a razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima da pele protegida pelo protetor solar em análise (DEMp), aplicado na quantidade de 2,0 $mg.cm^{-2}$ e a Dose Eritematosa Mínima da pele não protegia (DEMnp). Esta relação é expressa conforme a equação 4 abaixo.

$$FPS = \frac{DEMp\ (pele\ protegida)}{DEMnp\ (pele\ não\ protegida)} \qquad \text{Eq. 4}$$

A determinação do valor do FPS é feita pela irradiação de áreas da pele protegidas e não protegidas com os protetores solares, localizadas na região do dorso dos voluntários, com doses progressivamente crescentes de radiação ultravioleta geradas por um simulador solar. As leituras das Doses Eritematosas Mínimas são realizadas após 16 a 24 horas da exposição UV. Com isso é possível calcular a razão entre as doses e obter o Fator de Proteção Solar para cada voluntário (FPSi). O conjunto de resultados de FPSi sofre tratamentos estatísticos para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) do produto.

O que se seguiu a partir da publicação da monografia FDA de 1978, em termos de metodologias para determinação do FPS foram, basicamente, melhorias nas especificações dos equipamentos simuladores solares, progressões de doses UV administradas, critérios estatísticos de aceitação de resultados, número de

voluntários a serem recrutados, etc. Um breve levantamento bibliográfico sobre o desenvolvimento de metodologias *in vivo* para determinação do FPS de protetores solares será descrito a seguir.

1.8.1 Metodologias *in vivo* para determinação do FPS

A avaliação *in vivo* da eficácia de protetores solares foi relatada, pela primeira vez que se tem conhecimento, por Friedrich Ellinger em 1934[63,64,] através da determinação do eritema na pele protegida e não protegida do antebraço de voluntários. Neste caso, o coeficiente de proteção proposto era inversamente proporcional ao nível de proteção solar apresentado pelo produto em teste[63],[64].

O grande precursor do que foi posteriormente denominado Fator de Proteção Solar (FPS) foi o cientista alemão Rudolf Schulze[65], que em 1956 propôs testar os protetores solares comercialmente disponíveis atribuindo-lhes valores numéricos indicativos do Fator de Proteção. Diferentemente do que fez Ellinger, Schulze utilizou fontes UV artificiais cujos espectros eram bem mais próximos do espectro solar natural, além de propor a utilização de uma série crescente de intensidades UV (progressão de 40%) em áreas protegidas e não protegidas da pele.

Melhorias sobre o método proposto por Schulze foram publicadas por Greiter[66] em 1974, que desenvolveu o conceito de Fator de Proteção Solar. Em 1978, este método foi adotado e normatizado pela agência regulatória Norte Americana (FDA)[62], tornando-se assim internacionalmente aceito. Em 1984 foi publicada na Alemanha a norma DIN67501[67], que diferia daquela publicada pelo FDA em 1978 principalmente na quantidade de produto aplicado sobre a pele (1,5 mg. cm^{-2} contra os 2,0 $mg.cm^{-2}$ propostos pelo FDA) e a fonte UV utilizada (lâmpada

de mercúrio ou luz natural contra lâmpada de arco de xenônio proposto pelo FDA). Tais diferenças levaram a grandes discrepâncias de resultados entre as normas.

As normas que se seguiram a partir de então mantiveram as especificações do FDA 1978 com relação à fonte UV (lâmpada de arco de xenônio) e quantidade de produto aplicado sobre a pele (2,0 $mg.cm^{-2}$)[30,68,69,70,71]. A agência Americana FDA publicou em 1993[72] uma proposta de monografia final que foi consolidada em 1999[73]. Entretanto, uma nova proposta de metodologia foi feita pelo FDA em 2007[74], mas até o momento não houve um parecer final sobre a mesma.

Na Europa, a Associação da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria (*Comité de Liason des Associations Européenes de Insdustrie et la Perfumerie* – COLIPA) publicou sua primeira monografia em 1994[75], que evoluiu para o método conhecido por *International Sun Protection Factor Test Method* (ISPF) em 2003[76]. A última revisão deste método ocorreu em 2006 e agora é apoiado pelas associações Européia (COLIPA), Sul Africana (CTFA-SA), Japonesa (JCIA) e Americana (CTFA-USA)[77].

Uma ordem cronológica das publicações dos métodos de teste para determinação do FPS *in vivo* é apresentada na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Evolução cronológica dos métodos de determinação do FPS *in vivo*.

Ano	Instituição ou Autoridade Regulatória	Território
1978	Food and Drug Administration (FDA)	Estados Unidos da América
1983	Standards Association of Australia (SAA)	Austrália
1984	Deutches Institut für Normung (DIN)	Alemanha
1991	Commission Internationale De L´Eclairage (CIE)	Internacional
1992	Japanese Cosmetic Insdustry Association (JCIA)	Japão
1993	FDA - Revisão	Estados Unidos da América
1994	European Cosmetic and Toiletries Association (COLIPA)	Europa
1998	Standards Australia / Standards New Zealand (AS/NZS) - revisão	Austrália e Nova Zelândia
1999	FDA - Revisão	Estados Unidos da América
2003	International SPF Test Method - revisão (COLIPA/JCIA/CTFA-SA)	Europa, Japão e África do Sul
2006	International SPF Test Method - revisão (COLIPA/JCIA/CTFA-SA/CTFA-USA)	Europa, Japão e África do Sul e EUA
2007	FDA - Revisão	Estados Unidos da América

Adaptado de Brown[78].

Diversos países e grupos econômicos ao redor do mundo adotaram o método Colipa/Internacional e/ou o método americano como referência para avaliação dos protetores solares que estão sob sua regulamentação. Este é o caso do Brasil que tem um regulamento técnico sobre protetores solares desde 2002 (Resolução Anvisa nº 237, de 22 de agosto de 2002)[79].

Pela grande aceitação internacional e também pela tendência de aceitação como método de teste oficial da ISO (ISO 24444:2010)[80], nos próximos tópicos serão apresentados mais detalhes do *International Sun Protection Factor Test*

Method (ISPF). Este também foi o método utilizado para os testes realizados nessa dissertação.

1.8.1.1 Método *International SPF Test Method* 2006

O método Internacional é um método de laboratório que utiliza como fonte de radiação um simulador solar com lâmpada de arco de xenônio. Para a determinação do FPS, séries incrementais de respostas eritematosas são induzidas em um número de pequenos sub-sítios da pele de voluntários humanos, sendo a área de irradiação restrita às costas dos voluntários.

No mínimo três sítios são irradiados por teste: uma área não protegida, uma área protegida com a amostra em estudo e uma área protegida com um protetor solar referência de FPS conhecido. As respostas eritematosas mínimas (DEM) observadas no período de 16 a 24 horas após a exposição UV são determinadas e utilizadas para o cálculo do FPS individual (FPSi) da amostra e do produto referência.

O FPS da amostra é dado pela média aritmética de todos os resultados válidos de FPSi. No mínimo 10 e no máximo 20 resultados válidos devem ser utilizados para o cálculo do FPS. Os intervalos de confiança para a média do FPS devem estar compreendidos pela faixa de 17% do FPS médio.

1.8.1.1.1 Seleção dos voluntários

Os voluntários incluídos no estudo não podem estar bronzeados e devem pertencer aos fototipos I, II ou III, de acordo com a classificação de Fitzpatrick ou ângulo tipológico individual (ITA^{o}) superior a 28. O ângulo tipológico individual (ITA^{o}) é calculado através de uma relação entre os parâmetros de cor L*a*b (CIE 1976,

vide nota abaixo) conforme Equação 5[81] e Figura 7. As categorias de cor da pele em função do valor de ITA^{o} estão relacionadas na Tabela 4 abaixo. Segue também na Figura 7 a seguir uma ilustração da relação entre ITA^{o} e as categorias de cor da pele.

$$ITA^{o} = \frac{\left[ArcTangente\left(\frac{L^{*}-50}{b^{*}}\right).180\right]}{\pi} \qquad \text{Eq. 5}$$

Tabela 4 - Categorias de cor da pele em função do ITA^{o} (Fonte: Colipa 2004).

Categorias de Cor da Pele	*Valores de ITA°*
Muito Clara	>55°
Clara	41 a 55°
Intermediária	28 a 41°
Bronzeada	10 a 28°
Marrom	–30 a 10°
Negra	< –30°

Nota: Os parâmetros de cor L*a*b referem-se a um modelo cromático usado normalmente para descrever todas as cores que pode perceber o olho humano. Foi desenvolvido especificamente com este propósito pela *Commission Internationale d'Eclairage* (Comissão Internacional de Iluminação), razão pela qual se abrevia CIE.

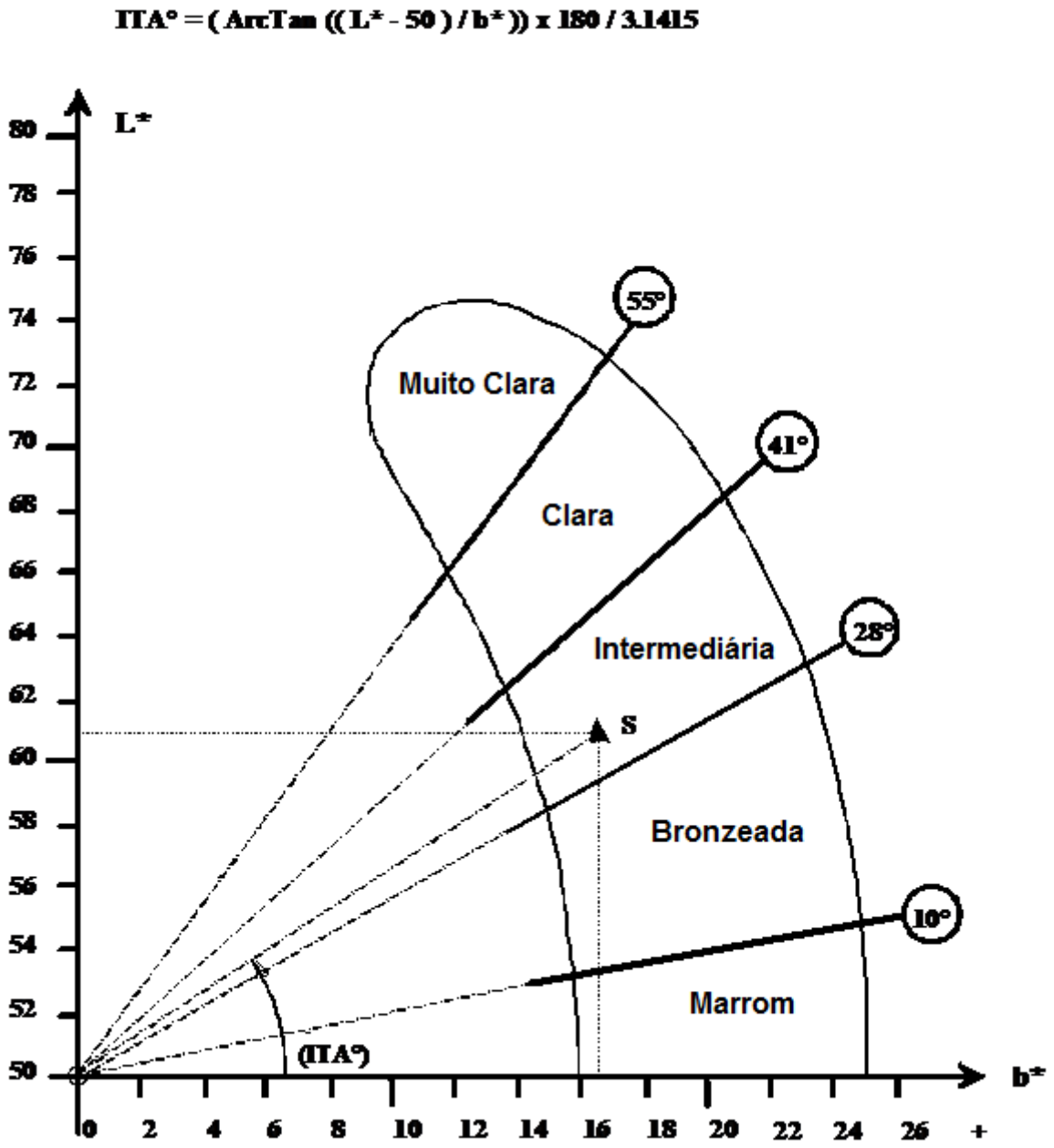


Figura 7 - Categorização da cor da pele através do cálculo do ângulo tipológico individual (ITA^{o}). Fonte: Colipa[75].

Em cada estudo, o número mínimo e máximo de resultados válidos deve ser igual a 10 e 20, respectivamente. No máximo 5 resultados individuais podem ser excluídos dos cálculos do FPS médio e cada exclusão deve ser justificada.

1.8.1.1.2 Área de teste

Os ensaios devem ser realizados somente na região das costas, com áreas demarcadas em regiões entre a linha da escápula e da cintura dos voluntários. Deve-se evitar regiões da pele que apresentem marcas e/ou manchas.

1.8.1.1.3 Fonte de radiação ultravioleta

O simulador solar com lâmpada de arco de xenônio e filtros apropriados deve emitir um espectro contínuo na região do ultravioleta. Sua fonte de luz deve ser estável e uniforme, de modo a atender aos critérios de qualidade espectral especificados pela norma.

1.8.1.1.4 Protetor Solar de referência

A fim de se validar os resultados de FPS e verificar o procedimento de teste, são propostos alguns Protetores Solares de referência com valores de FPS conhecidos (Padrões). Portanto uma formulação referência deve ser testada no mesmo dia em que se avaliam outras amostras.

As faixas de FPS esperadas para os Protetores Solares de referência são apresentadas na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - FPS e limites de aceitação para os Protetores Solares de referência.

Protetor Solar de referência	**FPS médio**	**Faixa indicativa (± 2DP)**	
		Limite inferior	**Limite superior**
P2	16,6	14,2	19,0
P3	16,2	13,8	18,7
P7	5,1	4,4	5,9

Se o FPS médio do Protetor Solar de referência não estiver dentro da faixa indicativa ou se o intervalo de confiança (IC 95%) do valor médio do Protetor Solar de referência não estiver dentro da faixa de 17% do FPS médio calculado, todo o teste deve ser rejeitado.

A escolha do Protetor Solar de referência depende do FPS esperado para a amostra que será avaliada.

Se o FPS esperado for inferior a 20, pode-se utilizar qualquer um dos três padrões existentes (P2, P3 ou P7).

Se o FPS esperado for igual ou superior a 20, deve-se utilizar o padrão P2 ou o padrão P3.

1.8.1.1.5 Quantidade e aplicação dos produtos

A quantidade de produto aplicado na pele e a uniformidade do filme aplicado no processo de espalhamento afetam a magnitude e variabilidade dos resultados[82].

A área teste deve possuir no mínimo 30 cm^2 e no máximo 60 cm^2 e deve ser demarcada com uma caneta cirúrgica, sendo que a área não protegida deve estar próxima da área protegida com o produto a ser avaliado. Para reduzir erros sistemáticos devido a diferenças anatômicas, as áreas de teste devem ser selecionadas de forma a gerar um conjunto aleatório ao se considerar o grupo de voluntários.

A quantidade de amostra a ser aplicada e espalhada na pele deve ser de 2,00 $mg.cm^{-2}$ ± 2,5% e a sensibilidade da balança deve ser de pelo menos 0,1 mg, isto é, pelo menos 4 casas decimais.

Para se obter um filme uniforme de produto ao longo de toda a área delimitada, deve-se depositar gotas do produto utilizando-se uma seringa/pipeta, e

espalhá-las com o dedo ao longo de todo o sitio de teste de modo a formar um filme uniforme. O tempo gasto nesse processo deve ser de 20 a 50 segundos, dependendo da facilidade de espalhamento do produto. Além disso, deve-se aguardar de 15 a 30 minutos antes do início da exposição UV, para permitir a secagem do produto.

1.8.1.1.6 Exposições UV

O simulador solar deve estar aquecido e estabilizado antes do início da irradiação dos voluntários. Geralmente um período de 10 minutos é suficiente para atingir a condição de estabilização. As irradiações podem ser feitas com os voluntários sentados ou de bruços, desde que se garanta a permanência do produto na área aplicada. A área mínima de exposição UV nos sub-sítios deve ser de 0,5 cm^2 (recomenda-se pelo menos 1,0 cm^2) e a distância mínima entre cada sub-sítio deve ser de 0,8 cm.

Antes de se iniciar o teste principal, é conveniente que se determine a DEMnp (dose eritematosa mínima da área não protegida) individual a fim de se estimar e centralizar a faixa de doses UV que serão utilizadas para a determinação do FPS_i. Isso pode ser feito através de uma série de irradiações preliminares (até uma semana antes do teste principal) ou através de cálculos e estimativas da DEMnp por técnica colorimétrica (sem a necessidade de exposição UV dos voluntários). Este cálculo preditivo da DEMnp dos indivíduos foi proposto por Mérot e Masson[83] e adotado pela COLIPA[75] em 1994, e baseia-se na interpolação de valores calculados de ITA^o em um banco de dados previamente estabelecido utilizando-se um grande número de resultados de DEMnp x ITA^o conforme ilustrado na Figura 8.

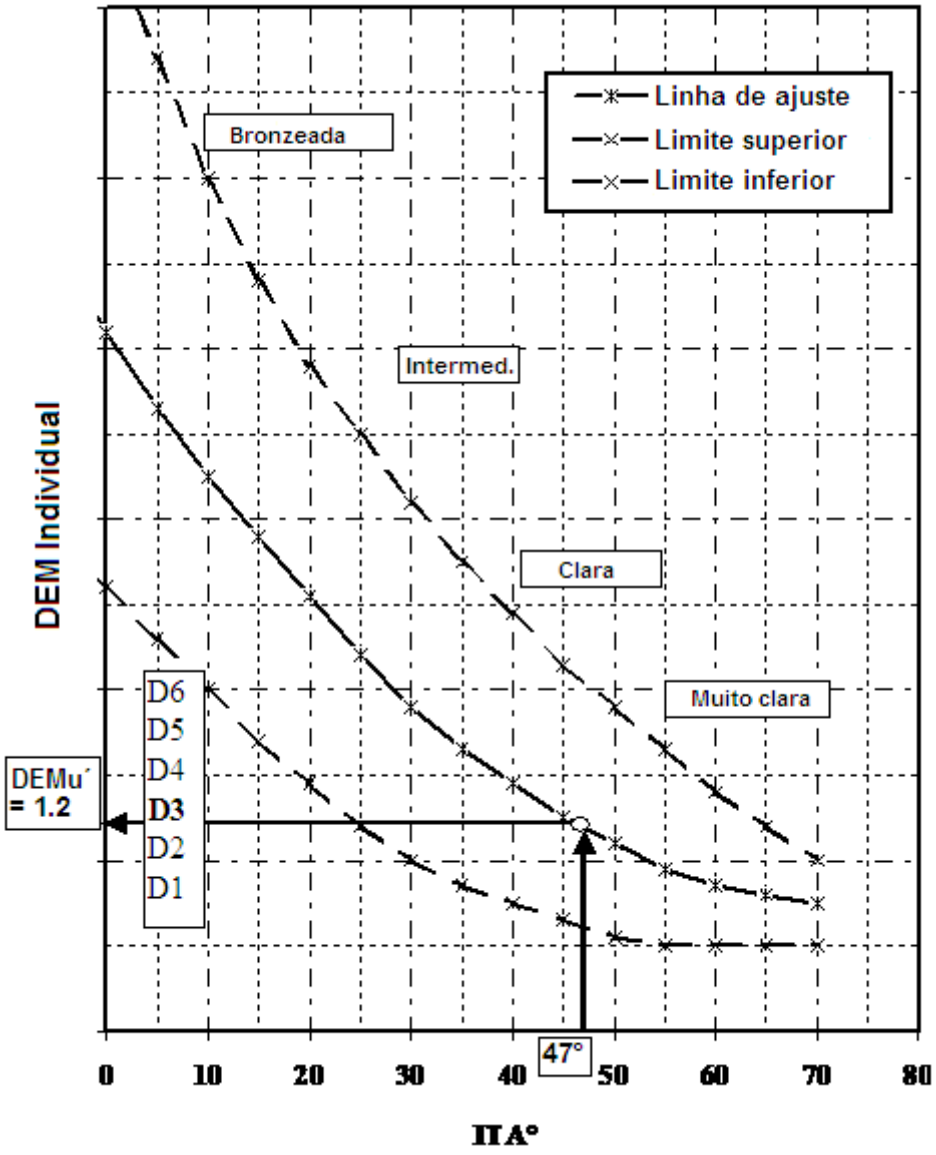


Figura 8 – Gráfico preditivo de Dose Mínima Eritematosa versus Ângulo Tipológico Individual (ITA^{o}). Fonte: Colipa[75].

Em termos do número de sub-sítios para irradiação UV, a norma determina um número mínimo de 5 sub-sítios ajustados para fornecerem doses UV incrementais segundo uma progressão geométrica com fator igual a 1,25 (se o FPS esperado para o produto em teste for menor que 25) ou igual a 1,12 (quando o FPS esperado para o produto em teste for maior que 25).

A exposição UV da área protegida deve ser feita com a mesma faixa de irradiâncias utilizada para expor a área não-protegida, porém, o tempo de irradiação

da área protegida deve ser calculado pela multiplicação do FPS esperado da amostra pelo tempo utilizado para expor a área não-protegida.

O ajuste das irradiâncias em cada guia de luz do simulador solar deve ser feito por meio de um radiômetro apropriado.

Após as exposições UV, deve-se remover as amostras da pele dos voluntários com algodão embebido com loção removedora.

1.8.1.1.7 Procedimento para determinação da Dose Eritematosa Mínima (DEM)

A determinação da Dose Eritematosa Mínima (DEM) deve ser realizada quando a resposta eritematosa é ótima, ou seja, entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UV. É muito importante que a DEM das áreas protegidas e não-protegidas sejam determinadas concomitantemente. Esta determinação é feita de forma visual por um profissional treinado e deve ser realizada em uma sala com iluminação suficiente e uniforme (pelo menos 450 lux).

A Dose Eritematosa Mínima da pele não-protegida (DEMnp) é considerada como sendo a quantidade de energia radiante necessária para produzir a menor vermelhidão perceptível e indubitável, avaliada de 16 a 24 horas após a exposição UV.

A Dose Eritematosa Mínima na pele protegida (DEMp) é considerada como sendo a quantidade de energia radiante necessária para produzir uma vermelhidão indubitável equivalente àquela correspondente a DEMnp, avaliada por comparação visual, de 16 a 24 horas após a exposição UV.

A DEM normalmente é expressa em termos de energia ($J.m^{-2}$, $mJ.cm^{-2}$) ou tempo (segundos, minutos).

O teste deverá ser rejeitado se uma das seguintes circunstâncias ocorrerem:

- As séries de exposições UV falharem na elucidação da resposta eritematosa após 16 a 24 horas da irradiação.
- As respostas eritematosas de uma série de exposições estiverem aleatoriamente ausentes após 16 a 24 horas da irradiação.
- Todos os sub-sítios de uma série de exposições apresentarem respostas eritematosas após 16 a 24 horas da irradiação.

Quando qualquer uma das circunstâncias acima ocorrer na área não-protegida ou na área com o Protetor Solar referência, os dados de todos os outros sítios de teste no voluntário devem ser rejeitados.

Se a rejeição de dados ocorrer em mais de 5 voluntários, todo o estudo deve ser rejeitado.

1.8.1.1.8 Cálculo do Fator de Proteção Solar e critérios estatísticos

O FPS de cada produto é a média aritmética dos valores de FPS individuais (FPSi) de todos os voluntários incluídos no estudo, expressa apenas com uma casa decimal.

O conjunto de resultados obtidos no estudo deve gerar um valor de FPS médio com uma faixa de variação máxima de 17% dentro dos limites de um intervalo de confiança *t*-Student de 95%.

$$FPS = \frac{\sum FPSi}{n} \qquad \text{Eq. 6}$$

com n = 10 a 20 voluntários.

O desvio padrão da média (*s*) é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(FPSi)^2 - \sum(FPSi)^2/n}{n-1}} \quad \text{Eq. 7}$$

O intervalo de 95% de confiança (95% IC) da média é expresso como:

$$95\%\ IC = [FPS\text{-}c\ ;\ FPS\text{+}c] \quad \text{Eq. 8}$$

onde

$c = t.s.(n)^{-1/2}$

s = desvio padrão da média

n = número total de voluntários

t = valor *t* na tabela de classificação bilateral de "*t*-Student" com probabilidade p=0,05 e grau de liberdade n-1

1.8.2 Metodologias *in vitro* para determinação do FPS

Os métodos *in vitro* para a determinação do Fator de Proteção Solar em geral são de dois tipos: métodos que envolvem medidas de absorção/transmissão da radiação UV através de filmes de protetores solares aplicados em algum substrato e métodos em que as características de absorção dos protetores solares são determinadas com base na análise espectrofotométrica de soluções diluídas.[84,85,86,87,88] Os métodos baseados em medidas espectrofotométricas de filmes de produtos foram ganhando vários adeptos e hoje em dia são os mais amplamente utilizados[89].

Diffey e Robson[90] introduziram em 1989 a aplicação do substrato Transpore™. Os cálculos do FPS *in vitro* eram baseados em fórmulas conhecidas. As dificuldades e deficiências desse tipo de substrato foram apontadas por Kelley[91] e Spruce and Hewitt[92]. Substratos de pele natural também têm sido utilizados, apesar dos seus problemas de homogeneidade e transparência.

Pearse e Edwards[93] fizeram um comparativo entre os substratos Transpore™ e estrato córneo humano e encontraram diferenças significativas para protetores solares com FPSs maiores que 20. Marginean[94] e Stokes e Diffey[95] também testaram a epiderme humana como substrato.

Devido à heterogeneidade e opacidade, disponibilidade limitada e dificuldade de manuseio de substratos naturais, tentativas recentes de padronização estão levando em consideração o uso de substratos sintéticos com face rugosa como o caso das placas de poli(*metil*-metacrilato) (PMMA)[96] e pele sintética VitroSkin®[97].

Pissavini et al.[98] conduziram um teste interlaboratorial para a determinação do FPS *in vitro* e determinação da sua reprodutibilidade entre 5 laboratórios independentes. Foram observadas diferenças de até 50% nos valores de FPS encontrados em diferentes laboratórios.

De uma forma geral esses métodos de determinação do FPS *in vitro,* que se baseiam em medidas espectrofotométricas de filmes de protetores solares, levam em consideração a seguinte abordagem matemática desenvolvida por Mansur em 1986[86]:

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E_\lambda . S_\lambda . d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E_\lambda . S_\lambda . T_\lambda d\lambda} \qquad \text{Eq. 9}$$

Onde E_λ é a efetividade espectral eritematosa, S_λ é a irradiância solar espectral esperada para um dia não nublado ao meio dia no verão numa latitude de 40ºN e T_λ é a transmitância espectral da amostra.

Os parâmetros E_λ e S_λ são constantes e suas funções são ilustradas na Figura 9 a seguir.

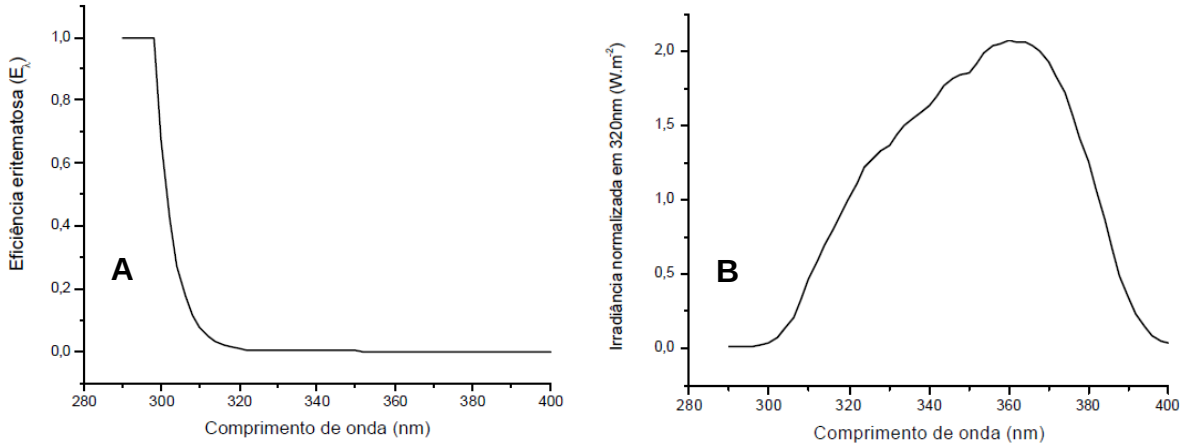


Figura 9 – A) Espectro de ação eritematosa e B) Irradiância solar espectral esperada em 40°N.

O parâmetro T_λ está relacionado com a transmitância de luz na faixa de 290 a 400 nm para uma amostra de protetor solar. Logo, depende diretamente da espessura do filme de produto aplicado, forma de aplicação do filme de produto sobre o substrato, das propriedades do substrato ao qual o filme de produto foi aplicado, das possíveis interações entre os componentes químicos da amostra e do substrato, etc.

As interações entre um filme de protetor solar, o substrato e a radiação eletromagnética é complexa e leva em consideração uma série de aspectos físicos como pode ser observado na Figura 10. Se o filme de protetor solar e o substrato possuem faces lisas (baixa capacidade de espalhamento de luz), parte dessa radiação atravessa diretamente esse sistema enquanto a outra parte é refletida diretamente (Figura 10a). Se o filme de protetor solar é um meio difuso (principalmente por conter filtros inorgânicos como TiO_2 e ZnO), ambas as radiações incidentes e refletidas na interface, são espalhadas em todas as direções, sendo parte delas novamente redirecionadas para o substrato (Figura 10b). Se o substrato possuir uma superfície rugosa, como no caso das placas de PMMA e de quartzo

rugoso, a radiação será retro-espalhada em todas as direções naquela interface (Figura 10c). Uma quarta possibilidade pode acontecer quando ambos os meios forem difusos, como no caso de protetores solares aplicados sobre VitroSkin® (Figura 10d). Nesse caso é grande a dificuldade de se criar um modelo capaz de prever o caminho óptico da radiação.

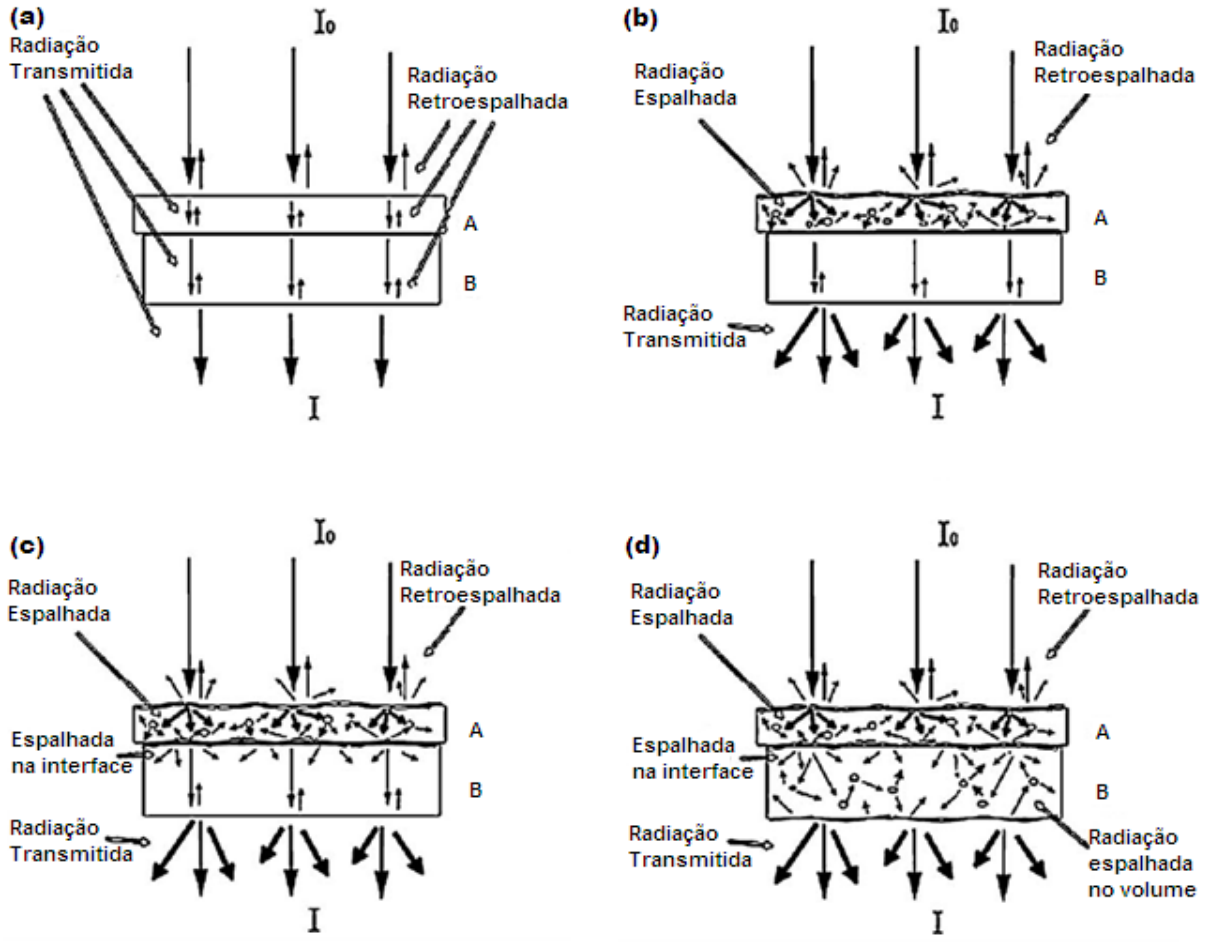


Figura 10 – Visualização esquemática da interação da luz com dois diferentes materiais. (**a**) meio A e meio B não difusos; (**b**) meio A difuso em seu volume e meio B não-difuso; (**c**) meio A difuso em seu volume e meio B difuso na superfície; (**d**) meio A difuso em seu volume e meio B difuso em seu volume. A=protetor solar, B=substrato. Adaptado de Garoli[99].

Portanto, fica evidente que a escolha do substrato deve interferir de forma significativa nas medidas de transmissão de luz de filmes finos de protetores solares.

Outros parâmetro que podem influenciar as medidas de transmissão de filmes finos de protetores solares estão relacionados às limitações técnicas dos equipamentos de medida. O número de fótons que chegam ao fotodetector dos espectrofotômetros pode se tornar insuficiente para a realização de medidas (“saturação de sinal”) no caso de amostras altamente absorvedoras (produtos com altos fatores de proteção). Além disso, para maior eficiência na captação da radiação transmitida, é conveniente que os espectrofotômetros sejam equipados com esferas de integração.

O fato de ainda não termos um método *in vitro* amplamente aceito pela comunidade internacional para a determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas está diretamente relacionado ao controle de todas essas variáveis e fontes de erros. Portanto, o desenvolvimento de métodos para a medida dos valores de FPS *in vitro*, com boa correlação com os métodos *in vivo*, é de enorme interesse de pesquisadores e empresas do setor cosmético em todo o mundo.

2 OBJETIVOS

Nesta dissertação, visamos o estudo e utilização de um dispositivo fotoquímico nanoestruturado como base para o desenvolvimento de uma metodologia alternativa *in vitro* para a avaliação do FPS de protetores solares, contribuindo para o desenvolvimento da química e nanotecnologia molecular. Tal desenvolvimento será realizado utilizando-se dosímetros UV supramoleculares obtidos pela imobilização de um complexo de ferro(II)polipiridina sobre filmes nanocristalinos de TiO_2, correlacionando-se os parâmetros de degradação fotoinduzida do corante inorgânico, na ausência e presença de protetores solares, com os resultados de FPS determinados em estudos clínicos conduzidos através de uma metodologia oficial e internacionalmente aceita.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

- Metanol – Synth®
- Acetona – Sigma-Aldrich®
- Etanol – Synth®
- Sulfato Ferroso heptahidratado – Sigma-Aldrich®
- Diclorometano – Merck®
- Hexafluorofosfato de amônio – Sigma-Aldrich®
- Dióxido de titânio P25 - Degussa®
- Acetilacetona – Sigma-Aldrich®
- Triton X-10 – Sigma-Aldrich®
- Carboximetil-beta-ciclodextrina – Sigma-Aldrich®

O preparo das soluções e os demais procedimentos utilizados estão detalhados nos capítulos seguintes.

3.2 Análise Elementar

As análises elementares de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em um equipamento Perkin Elmer modelo 2400, a partir da combustão das amostras sólidas dos compostos a 925 ºC em atmosfera de oxigênio.

3.3 Espectrometria de massas

Para obtenção dos espectros de massas foi utilizado um espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus da Bruker Daltonics com configuração de tempo de vôo ortogonal quadrupolar (Qq). As amostras foram solubilizadas em metanol e introduzidas por meio de bomba de seringa, controlando-se o fluxo em 180 $\mu L.h^{-1}$. Os espectros ESI-MS foram obtidos utilizando-se voltagens típicas de 4 kV no capilar e 20 V no cone.

3.4 Espectros Eletrônicos

Os espectros de absorção no UV-vis foram obtidos em um espectrofotômetro com detector de rede de diodos *Hewlett Packard* modelo 8453A na região do ultravioleta e visível, utilizando-se cubetas de quartzo de duas faces com caminho ótico de 1,0 cm; ou em um espectrofotômetro *FieldSpec* da *Analytical Spectral Devices,* equipado com fibra óptica para medidas na região de 290 a 1700 nm.

3.5 Espectroscopia Vibracional

Os espectros e imagem de microscopia Raman confocal foram obtidos em um microscópio Raman confocal WITec modelo Alpha 300R, equipado com laser de excitação em 532 nm e potência máxima 50 mW, utilizando-se objetiva de 100X e N.A. = 0,8.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando-se um microscópio JEOL modelo JSM-7401F, operando com uma voltagem de aceleração de 3 keV, da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.7 Sistema para estudos de fotodegradação

Os estudos de fotodegradação foram realizados utilizando-se uma fonte de radiação equipada com uma lâmpada de arco de xenônio (Applied Photophysics), com potência nominal de 150 W. Uma cubeta de vidro de 5,0 cm, preenchida com água foi utilizada para se avaliar os efeitos da radiação visível nos processos de fotodegradação do dosímetro. Os espectros UV-Vis foram coletados no espectrofotômetro de fibra óptica FieldSpec®, em modo de transmitância. Os dosímetros foram irradiados no interior de uma cubeta de quartzo de 1,0 cm, em atmosfera de ar ou nitrogênio. Durante os experimentos as condições de temperatura e umidade relativa foram padronizadas em 20 ± 2 ºC e 50 ± 5%, respectivamente.

3.8 Sistema para determinação do FPS *in vitro*

Os experimentos foram realizados irradiando-se dosímetros UV cobertos com pele artificial (conforme descrito no item 5.1.3) com um simulador solar (SolarLight®) de potência ajustável, equipado com lâmpada de arco de xenônio de 150 W. Espectros UV-Vis foram coletados em função do tempo utilizando-se o espectrofotômetro de fibra óptica *FieldSpec*®, em modo de transmitância. Durante os experimentos as condições de temperatura e umidade relativa foram padronizadas em 20 ± 2ºC e 50 ± 5%, respectivamente.

4 CONSTRUÇÃO DO DOSÍMETRO UV

4.1 Introdução

O Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN) do IQ-USP vêm desenvolvendo diversos trabalhos com compostos de coordenação e sistemas supramoleculares, que tem sido apresentados na forma de publicações internacionais e de teses e dissertações. Um desses trabalhos resultou na construção de um dispositivo de uso pessoal para o controle da exposição solar baseado em interfaces TiO_2/complexo obtidos por montagem supramolecular[100]. A característica mais marcante desse dispositivo é o perfil de resposta frente à radiação UV, que se assemelha à resposta da pele humana para a formação de eritemas. Esse fato motivou a realização do presente trabalho de mestrado, visando a aplicação daquele dispositivo para a determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas.

Nos capítulos subsequentes serão apresentadas as etapas necessárias para a construção do dispositivo, bem como os estudos de caracterização do material obtido. Também serão apresentadas as metodologias *in vitro* para a determinação do FPS e o comparativo de resultados obtidos pelos métodos *in vivo* e *in vitro*.

4.2 Estratégia supramolecular para construção do dispositivo UV

> *"A química supramolecular é a química das ligações intermoleculares, abrangendo as estruturas e o funcionamento das unidades formadas pela associação de duas ou mais espécies químicas."* Jean-Marie Lehn

Química Supramolecular, definida por Lehn[101] como a "química além da molécula", é baseada nas interações intermoleculares que formam estruturas

organizadas mais complexas[102]. Os conceitos delineados por este campo de investigação foram iniciados pelos trabalhos com compostos de inclusão como os clatratos[103,104,105,106], ciclofanos[107], éteres coroa[108] e criptandos[109] dedicados à geração de receptores sintéticos, ou hospedeiros.

No desenvolvimento do dosímetro UV foram utilizadas estratégias de construção supramolecular de tal forma a se combinar as propriedades de filmes nanocristalinos do semicondutor TiO_2 com as propriedades de um complexo de Fe(II)polipiridina. O resultado da sinergia dos dois materiais resultou em um sistema fotoquímico cuja fotodecomposição do complexo é proporcional à dose de radiação UV incidente. Além disso, o padrão de fotobranqueamento se assemelha ao padrão de resposta da pele humana à formação de eritemas quando exposta à radiação ultravioleta. Isso se deve ao fato do complexo de ferro isolado ser fotoquimicamente estável e o perfil de absorção do TiO_2 se assemelhar ao perfil da resposta eritematosa da pele na região do UV. Assim, somente as espécies reativas geradas pelo semicondutor no estado excitado levam à fotodegradação daquele corante. Essa propriedade é caracterizada pela maneira como o corante se encontra ligado à superfície do filme nanocristalino de TiO_2. Assim, o ancoramento por meio da formação de um complexo de inclusão entre a beta-ciclodextrina (previamente ligada à superfície do TiO_2) e o complexo hexafluorofosfato de bis-(4'-(4-bromofenil)-2,2':6',2"-terpiridina) ferro(II) $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ descrita abaixo, se mostrou a mais adequada para a nossa finalidade. A cavidade da beta-ciclodextrina atua como um hospedeiro que acomoda em seu interior o complexo de Fe(II) [110].

4.3 Síntese do composto $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$

O composto $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ foi preparado segundo o método descrito por Toma et al.[100], onde 0,25 g (0,90 mmol) de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ foram solubilizados em 25 mL de água destilada e misturados com 0,70 g (1,80 mmol) de 4'-(4-bromofenil)-2,2':6',2"-terpiridina (Br-ph-terpy), previamente dissolvida em uma quantidade mínima de CH_2Cl_2 e diluída em 15 mL de etanol. Após agitação dessa mistura por 1 h, uma solução saturada de NH_4PF_6 foi adicionada e deixada em repouso num refrigerador por 12 h. O sólido formado foi separado por filtração, lavado com etanol, seco sob vácuo e armazenado. O ligante Br-ph-terpy utilizado nessa síntese foi gentilmente fornecido pelo Dr. Juliano Bonacin.

$$FeSO_{4(aq)} + \quad 2\,Br-ph-tpy_{(EtOH)} + 2NH_4PF_{6(aq)} \rightarrow [Fe(Br-ph-tpy)_2](PF_6)_{2(s)} + (NH_4)_2SO_{4(aq)}$$

4.3.1 Caracterização do composto $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$

4.3.1.1 Geometria do complexo

A geometria otimizada do complexo foi calculada pelo método semi-empírico PM3[111] utilizando-se o software HyperChem© 7.0 conforme pode ser observado na Figura 11. Nesta figura é possível observar que o átomo de ferro(II) está coordenado a dois ligantes terpiridínicos tridentados, formando um arranjo local pseudo-octaédrico.

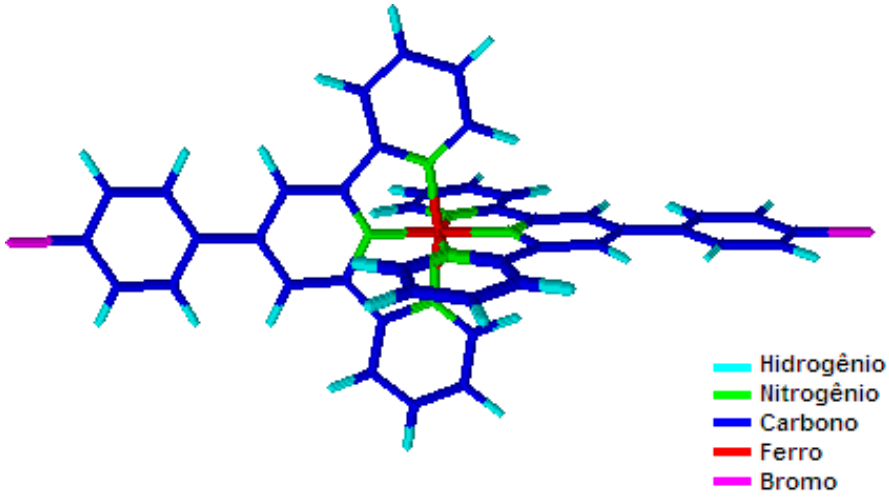


Figura 11 – Geometria otimizada do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$.

4.3.1.2 Análise Elementar

O complexo foi caracterizado por análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio. Os resultados foram consistentes com a estrutura proposta, sendo os valores muito próximos daqueles calculados para o composto como segue: C (exp. e calc.) = 43,4 e 44,8; H (exp. e calc.) = 2,5 e 2,5; e N (exp. e calc.) = 7,5 e 7,5.

4.3.1.3 Espectrometria de Massa

Uma técnica comumente utilizada na caracterização de complexos de metais de transição, particularmente complexos terpiridínicos pela sua elevada estabilidade, é a espectrometria de massas[112].

A técnica ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) foi escolhida para caracterização do complexo, pois a etapa de ionização e dessolvatação dos íons ocorre em condições brandas, de forma a não fragmentar os complexos[113]. Sendo assim, os resultados das medidas podem confirmar a presença do complexo sintetizado através da análise direta da relação *m/z* da molécula e do padrão isotópico do complexo, além de evidenciar as impurezas ionizáveis contidas na

amostra (Impurezas vindas possivelmente das etapas de síntese do ligante Br-ph-terpy).

O espectro de massa ESI (*Electrospray ionization*) no modo íon positivo foi obtido a partir de uma solução metanólica do complexo e é apresentado na Figura 12 abaixo.

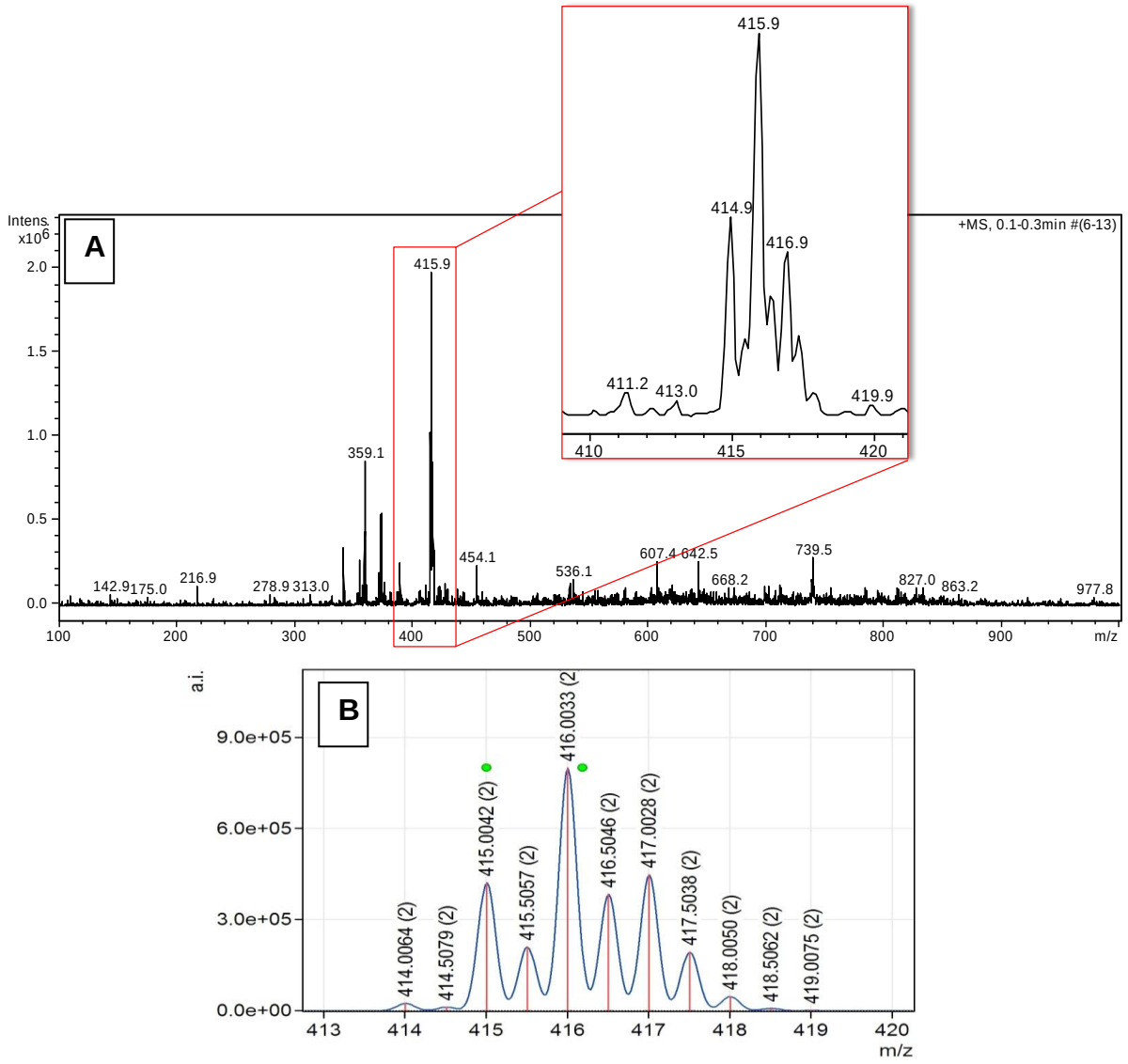


Figura 12 – (**A**) Espectro ESI-MS do complexo solubilizado em metanol com destaque em vermelho para a expansão do padrão isotópico centrado em m/z 415,9 e (**B**) Espectro teórico para $(C_{42}H_{26}N_6Br_2Fe)^{2+}$ calculado através do software mMass 3.8.0.[114]

O padrão isotópico obtido na análise (Figura 12A) e o simulado considerando-se a abundância isotópica dos átomos contidos no complexo (Figura 12B) são concordantes, confirmando que o sinal em m/z 415,9 é correspondente ao íon molecular $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$. O padrão isotópico deste complexo é gerado principalmente pela presença do átomo de Fe, que apresenta os isótopos Fe^{54} (5,85%), Fe^{56} (91,75%), Fe^{57} (2,12%) e Fe^{58} (0,28%).[115]

4.3.1.4 Espectroscopia Eletrônica

Foram obtidos espectros UV-Vis do complexo diluído em metanol (15,0 $\mu mol.L^{-1}$). Um espectro representativo é mostrado na Figura 13 abaixo.

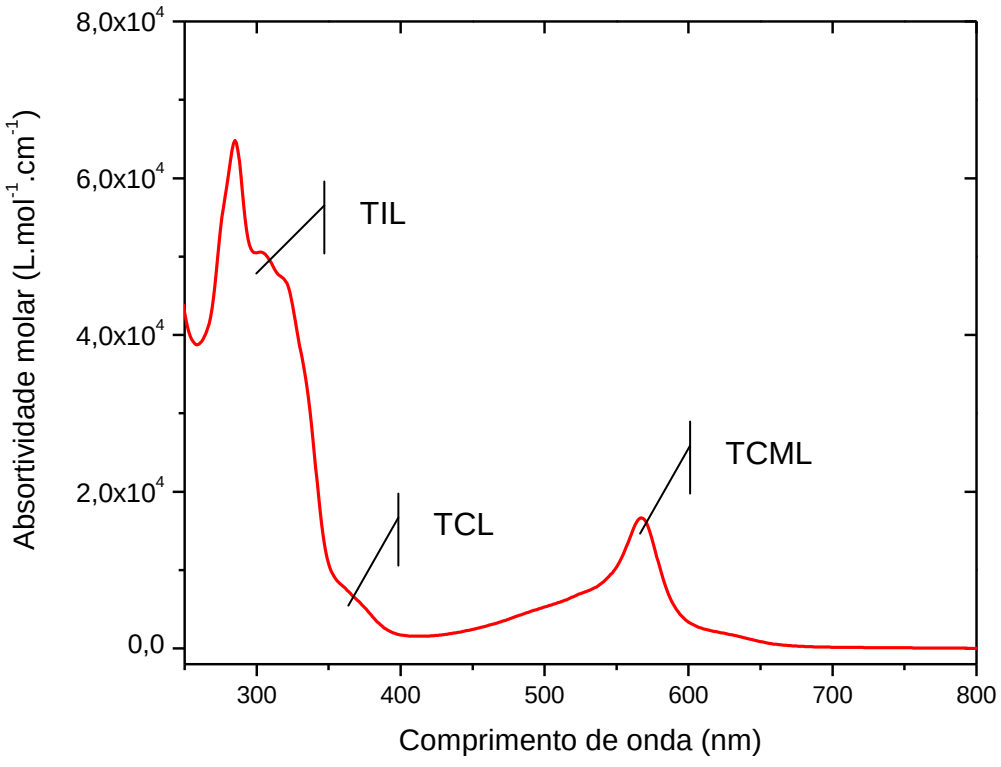


Figura 13 – Espectro eletrônico do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ a 15,0 x 10^{-6} $mol.L^{-1}$ em metanol. Sendo: TIL = transição interna do ligante, TCL = transição de campo ligante do íon metálico e TCML = transição de transferência de carga metal-ligante.

O complexo apresenta bandas intensas na região do UV que são características de transições interna do ligante (TIL) e atribuídas a transições $p\pi \rightarrow p\pi^*$ dos ligantes terpiridínicos. Com o processo de deconvolução (Figura 14) é possível inferir que existe um conjunto de cinco transições responsáveis pelo alargamento e assimetria do espectro nessa região. Em aproximadamente 370 nm observa-se uma banda fraca característica de complexos do tipo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ e atribuída a transição de campo ligante do metal (TCL) $d\pi \rightarrow d\pi^*$[116]. A banda na região do visível com intensidade máxima em 570 nm é característica de transições de transferência de carga metal-ligante $Fe(d\pi) \rightarrow terpy(p\pi^*)$. Esta banda é responsável pela cor púrpura das soluções diluídas do complexo. Todas estas atribuições estão em concordância com o espectro eletrônico do complexo descrito na literatura[116,117].

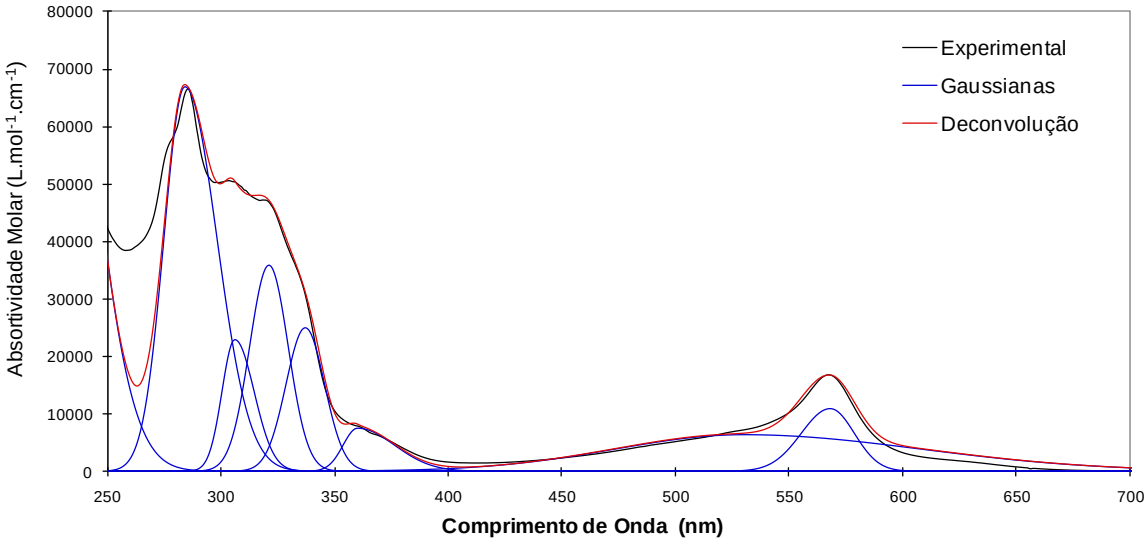


Figura 14 – Deconvolução do espectro eletrônico do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ em metanol.

4.4 Construção do Dispositivo UV

4.4.1 Preparação de filmes mesoporosos de TiO_2

O primeiro passo para a preparação dos filmes mesoporosos de TiO_2 consiste na obtenção de uma dispersão viscosa através da mistura de 9,0 g de TiO_2 P25 da Degussa (material nanocristalino constituído por cerca de 70% de anatase e 30% de rutilo,) em 3 mL de água destilada e 0,3 mL de acetilacetona em um almofariz com pistilo, por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, foram adicionados 12,0 mL de água destilada e 0,15 mL de Triton X-10 (polioxietileno-10-isooctilfenileter, Sigma-Aldrich), sob agitação.

Os filmes mesoporosos de TiO_2 foram obtidos dispersando-se a dispersão viscosa sobre vidro comum de microscopia utilizando-se o método “doctor blade”. Ou seja, a dispersão foi espalhada homogeneamente sobre uma área delimitada por fitas adesivas (Fita Mágica® da 3M) utilizando-se um bastão de vidro. Os filmes foram protegidos contra a deposição de poeira e secos em condições ambiente. Após a secagem e remoção das fitas adesivas, os filmes foram sinterizados em uma mufla à temperatura de 450 ºC, durante 30 minutos. Os filmes sinterizados apresentaram uma espessura de 6 ± 2 μm. O procedimento para a preparação dos filmes mesoporosos é mostrado esquematicamente na Figura 15.

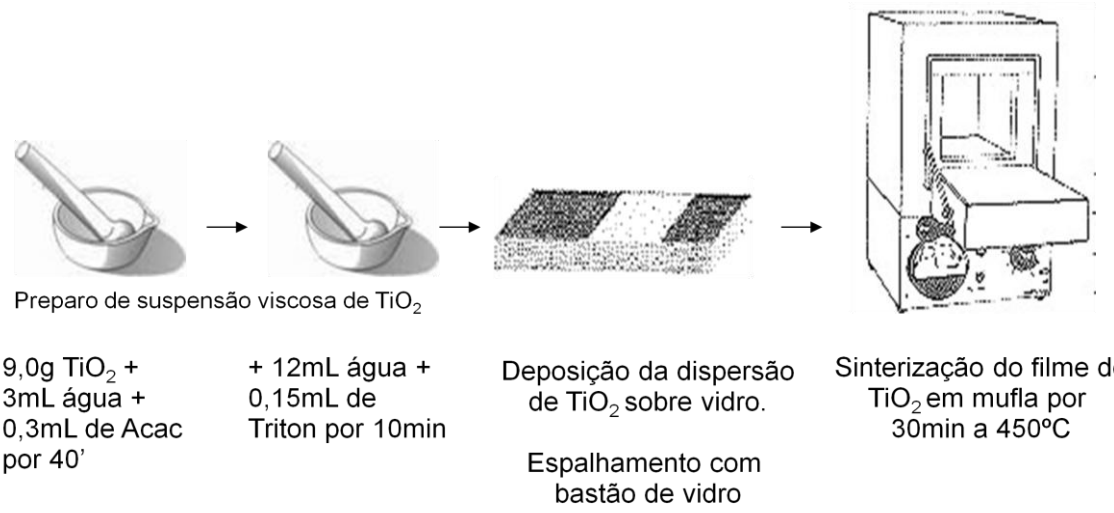


Figura 15 – Procedimento esquemático do processo de preparação dos filmes mesoporosos de TiO_2.

4.4.1.1 Caracterização dos filmes de TiO_2 por MEV

As características dos filmes mesoporosos de TiO_2 foram investigadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nesse caso específico foram avaliados filmes tratados termicamente a 100^{o}C e a 450^{o}C por 30 minutos. Os filmes apresentaram morfologias muito similares indicando baixo, mas suficiente transporte de massa para sinterização a 450 ºC, como pode ser observado na Figura 16.

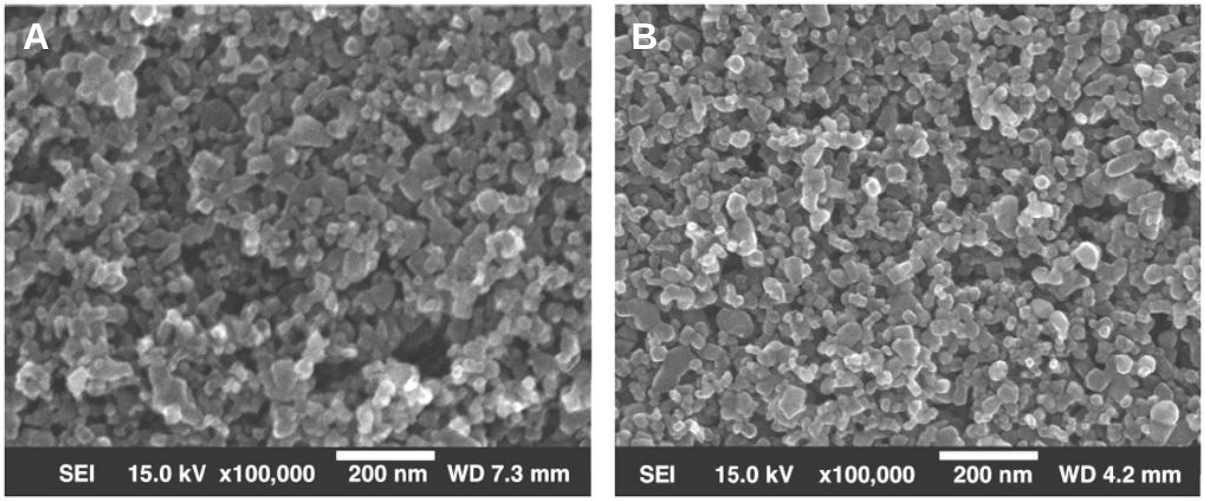


Figura 16 – Microscopia Eletrônica de Varredura de filmes mesoporosos de TiO_2 (Degussa P25) tratados termicamente a 100 ºC (A) e a 450 ºC por 30 minutos (B). Ampliação de 100.000 vezes.

Como pode ser observado na Figura 16, não houve modificações significativas na morfologia do filme em função da temperatura de calcinação na faixa de 100 a 450 ºC, por 30 minutos. Em ambos os casos é observada uma rede de grãos interconectados com tamanhos entre 20 a 70 nm. A sinterização branda em 450 ºC por um período de 30 minutos garante a formação de um filme com resistência mecânica adequada, mas sem que haja um processo de densificação que resulte em perdas de área superficial, garantindo assim elevado número de sítios ativos passíveis de adsorção. Os poros presentes no filme de TiO_2 possuem tamanhos na faixa de 30-50 nm

4.4.2 Funcionalização dos filmes de TiO_2 c/ ciclodextrina

Os filmes nanocristalinos de TiO_2 são reconhecidamente eficientes para adsorção química de substâncias devido ao elevado número de defeitos superficiais e sítios livres passíveis de ligação com diversas substâncias. Entretanto, em função das características químicas do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$, a sua interação com a superfície do TiO_2 é praticamente nula, já que não possui grupamentos coordenantes na sua estrutura[100]. Desta maneira, a estratégia adotada para a construção do dispositivo UV foi a funcionalização do TiO_2 com uma beta-ciclodextrina (CD), mais especificamente a carboxi-metil-β-ciclodextrina (CMβCD).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos, e tem sido extensivamente estudadas como moléculas hospedeiras em química supramolecular[118]. As três CDs mais utilizadas são a α-CD (6 unidades de glicose), a β-CD (sete unidades de glicose) e a γ-CD (oito unidades de glicose), como ilustradas na Figura 17.

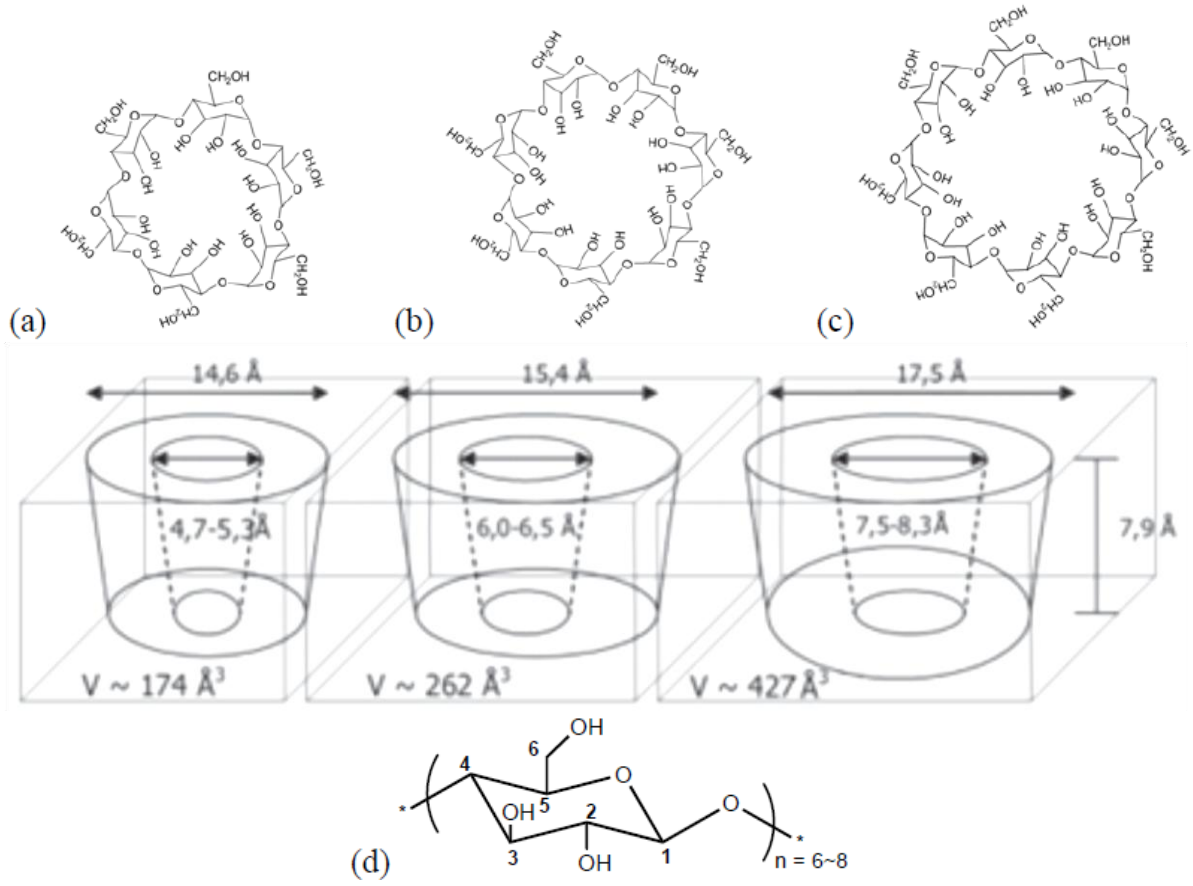


Figura 17 – Estruturas moleculares da (a) α-CD, (b) β-CD e (c) γ-CD. A ligação glicosídica α-1,4 é mostrada em (d).

A química supramolecular cobre todas as interações intermoleculares envolvendo espécies moleculares definidas por meio de interações que apenas perturbam as características das mesmas, mas podem envolver ligações fortes como as ligações covalentes. Todavia, muitas vezes as interações são mais fracas, como as baseadas em interações do tipo hóspede-hospedeiro. Devido ao fato das CDs terem em sua estrutura cavidades suficientemente grandes para acomodar espécies moleculares, elas são consideradas importantes espécies hospedeiras. CDs tem a habilidade de incluir moléculas “hóspedes” alterando suas propriedades físico-químicas e a biodisponibilidade, influenciando a atividade biológica através da formação de complexos de inclusão[119,120,121.] De fato, foi demonstrado por meio dos estudos realizados por Toma et al.[100], que a cavidade da β-CD possui dimensão

compatível para uma eficiente interação hóspede-hospedeiro com o complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$.

Uma forma de se aproveitar essa propriedade da β-CD de interagir com outras moléculas formando complexos do tipo hospedeiro/hóspede pode ser explorada para o ancoramento do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ à superfície do TiO_2. Mas para isso é fundamental que esta possua grupos funcionais que permitam a sua ligação à superfície do TiO_2, como no caso da carboxi-metil-β-ciclodextrina (CMβCD). Este apresenta diversos grupos carboxilato em sua estrutura (Figura 18) sendo um eficiente agente modificador de superfície dos filmes de TiO_2 nanocristalino. De fato, a CMβCD deve se ancorar paralelamente à superfície do TiO_2, ligando-se por meio dos sete substituintes com grupos carboxilato terminais.

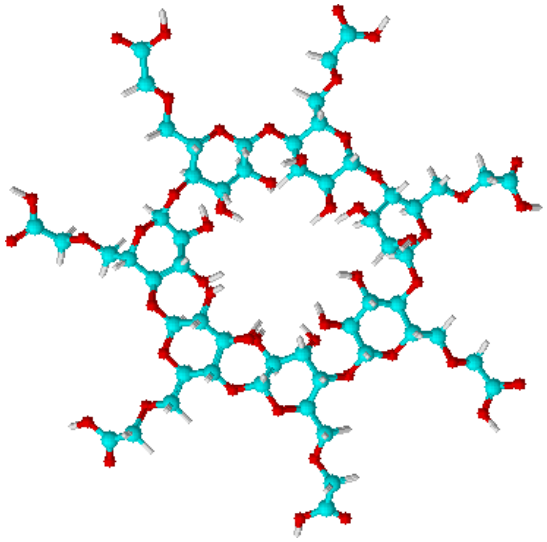


Figura 18 – Estrutura da carboxi-metil-β-ciclodextrina (CMβCD).

4.4.2.1 Funcionalização dos filmes mesoporosos de TiO_2

Os filmes nanocristalinos de TiO_2 foram quimicamente modificados em sua superfície por meio da imersão dos mesmos em solução metanólica 10 x 10^{-3} mol.L^{-1}

de CMβCD (carboxi-metil-β-ciclodextrina, Sigma-Aldrich) por 12 horas. Após esse período, os filmes funcionalizados foram lavados com etanol e acetona para remoção do excesso de CMβCD e mantidos num dessecador sob vácuo.

A quimiossorção da CMβCD sobre a superfície de filmes mesoporosos de TiO_2 utilizando-se o procedimento acima e sua caracterização através do emprego de técnicas como termogravimetria (TG) e espectroscopia infravermelho de reflectância difusa (ATR-FTIR) já está descrita na literatura[122]. No presente estudo optou-se pelo emprego da técnica de microscopia Raman confocal, pois permite a análise do material de forma não destrutiva, além de minimizar interferências devido à presença de água adsorvida na superfície do material. A banda de estiramento ν(CH) em 2920 cm^{-1} foi utilizada como marcador para demonstrar a presença da CMβCD na superfície do TiO_2 como pode ser observado na Figura 19 abaixo.

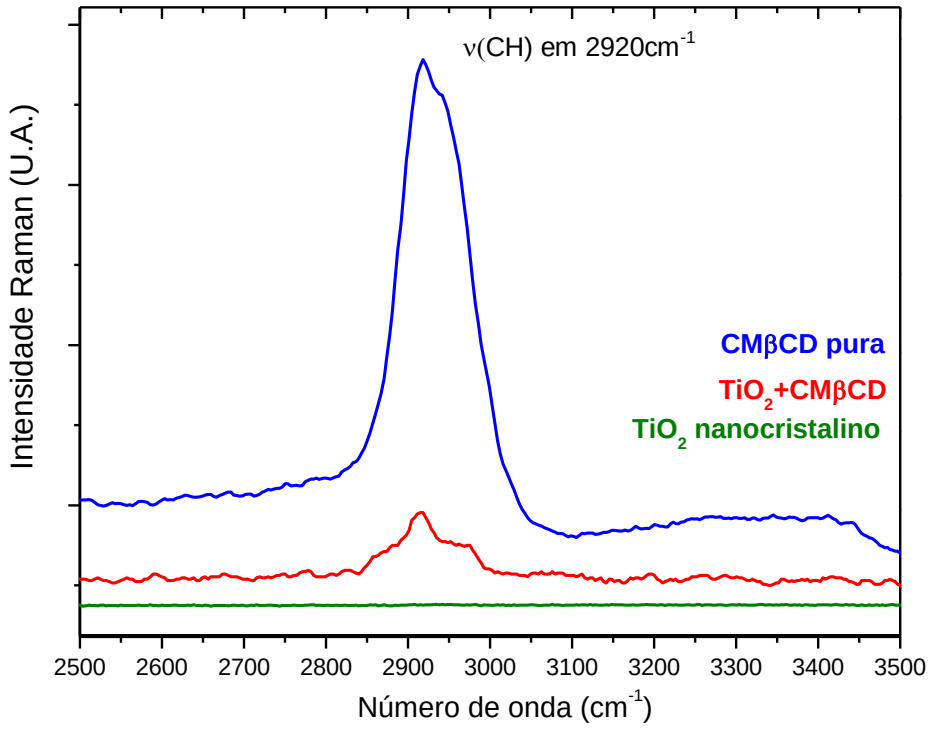


Figura 19 - Espectros FT-Raman da CMβCD pura, do filme de TiO_2 nanocristalino puro e do filme de TiO_2 nanocristalino modificado com CMβCD (λ_o = 532 nm). Os três espectros estão na mesma escala de intensidade Raman.

4.4.3 Adsorção do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ nos filmes funcionalizados de TiO_2

A adsorção do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ é possível graças à interação do tipo hóspede-hospedeiro do grupo bromo-fenila do ligante terpiridínico com a cavidade da CMβCD ancorada na superfície do filme nanocristalino de TiO_2. A estrutura esquemática do nanomaterial supramolecular é ilustrada na Figura 20.

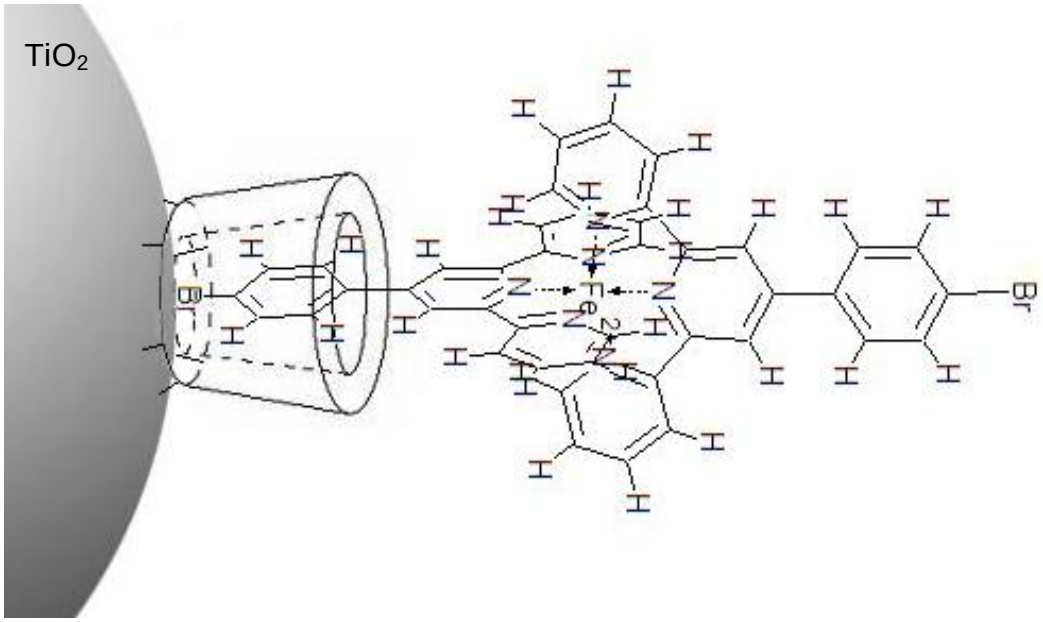


Figura 20 – Representação esquemática da estrutura do nanomaterial supramolecular formado pelo complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ e a CMβCD ancorada a superfície do TiO_2 nanocristalino.

O processo de formação do complexo hóspede-hospedeiro pode ser relativamente lento. Assim, filmes de TiO_2 nanocristalino previamente funcionalizados com CMβCD foram imersos em uma solução metanólica 20 x 10^{-3} $mol.L^{-1}$ do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ por um período de 12 horas. Após esse período, os filmes foram lavados com etanol e acetona para remoção do excesso de complexo e mantidos sob vácuo.

É interessante observar que o aparecimento de uma coloração roxa sobre a superfície do filme de TiO_2 só ocorre se este estiver modificado com a CMβCD. O complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ não possui grupos funcionais que possibilitem sua adsorção sobre o filme nanocristalino de TiO_2. Esse fato pode ser confirmado pela completa ausência de adsorção do corante sobre o filme não-modificado, como pode ser verificado na Figura 21A. Todavia, uma intensa coloração roxa pode ser observada quando o filme funcionalizado com CMβCD é empregado, confirmando que houve a formação do complexo hóspede-hospedeiro levando ao ancoramento do complexo de ferro(II) sobre o filme de TiO_2.

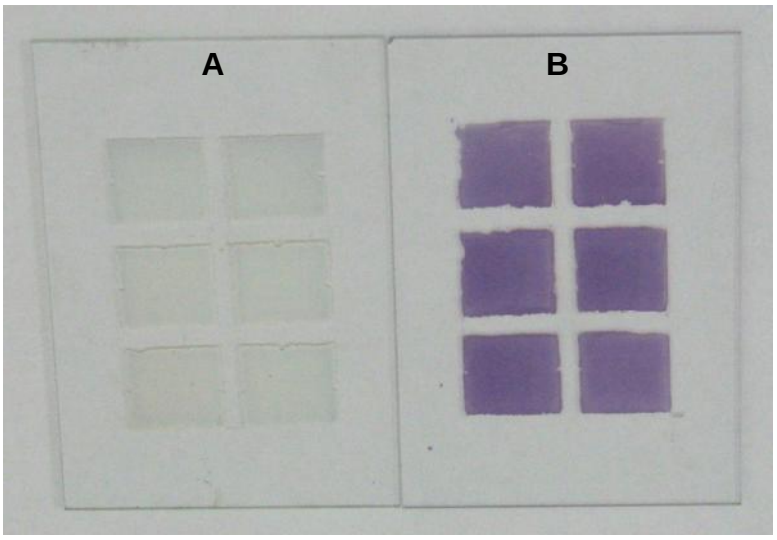


Figura 21 – Foto dos filmes de TiO_2 não modificado (A) e modificado com CMβCD (B) após imersão em solução metanólica 20 x 10^{-3} mol.L^{-1} do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ por um período de 12 horas.

4.4.3.1 Caracterização do dispositivo por Espectroscopia Raman

Dentre as técnicas descritas para a caracterização desse tipo de sistema podemos citar a análise termogravimétrica, a espectroscopia no infravermelho e determinação das isotermas de Langmuir[100]. Porém, com o objetivo de caracterizar o

sistema supramolecular foram realizados estudos de espectroscopia Raman dos componentes isolados, dos intermediários e do dispositivo final.

O primeiro componente isolado a ser analisado foi o filme nanocristalino de TiO_2. De acordo com Turkovic[123] os modos vibracionais Raman ativos do material nas fases cristalinas anatase e rutilo apresentam assinaturas espectrais distintas. Por se tratar de um filme obtido pelo uso do TiO_2 Degussa P25 (composto por 70% de fase anatase e 30% de fase rutilo, tamanho médio de partículas em torno de 26 nm), no espectro Raman da Figura 22 observa-se principalmente os modos vibracionais característicos do dióxido de titânio na fase anatase. As frequências vibracionais atribuídas aos modos permitidos para o TiO_2 na fase anatase em 148 cm^{-1} (E_g), 402 cm^{-1} (B_{1g}), 517 cm^{-1} (A_{1g}, B_{1g}) e 645 cm^{-1} (E_g) conforme espectro da Figura 22 são totalmente consistentes com aqueles descritos por Turkovic[123].

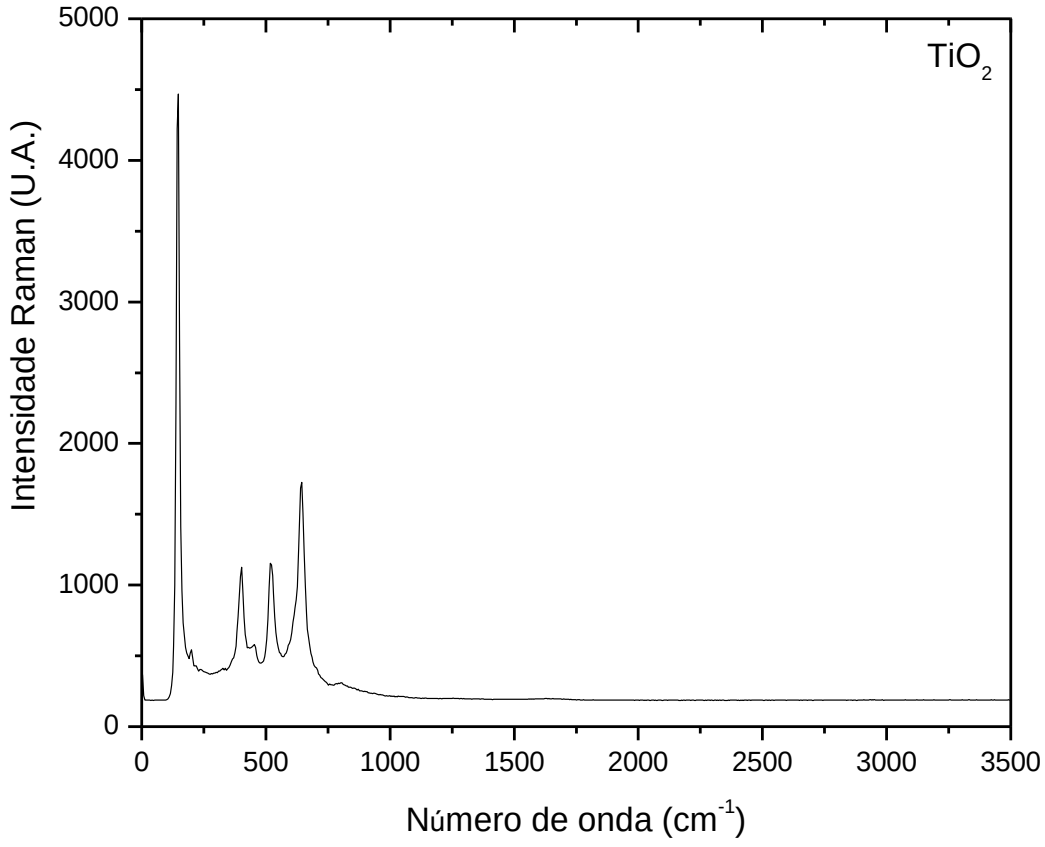


Figura 22 – Espectro FT-Raman do filme de TiO_2 (λ_o = 532nm).

O próximo componente isolado a ser analisado foi a CMβCD (carboxi-metil-β-ciclodextrina). No espectro Raman da Figura 23 a seguir observa-se diversas bandas na faixa de 400 a 1.500 cm^{-1} cujas atribuições são em grande parte relacionadas às deformações angulares (δ) de C-O-H, H-C-H e C-C-H[124]. Algumas bandas de destaque nessa região são atribuídas à δ(OCH) e δ(HCH) (1.457 cm^{-1}), δ(OCH) e δ(CCH) (1.416 cm^{-1}) e modo vibracional do anel piranose da estrutura sacarídea (1.127 cm^{-1}). Em 2.920 cm^{-1} observa-se uma banda intensa que pode ser atribuída ao estiramento ν(CH). Devido à sua intensidade e por estar localizada em uma região em que o TiO_2 não é ativo, decidiu-se utilizar esta banda do estiramento ν(CH) em 2.920 cm^{-1} como marcador para demonstrar a presença da CMβCD na superfície do TiO_2. O espectro Raman do TiO_2 modificado com CMβCD é apresentado na Figura 24.

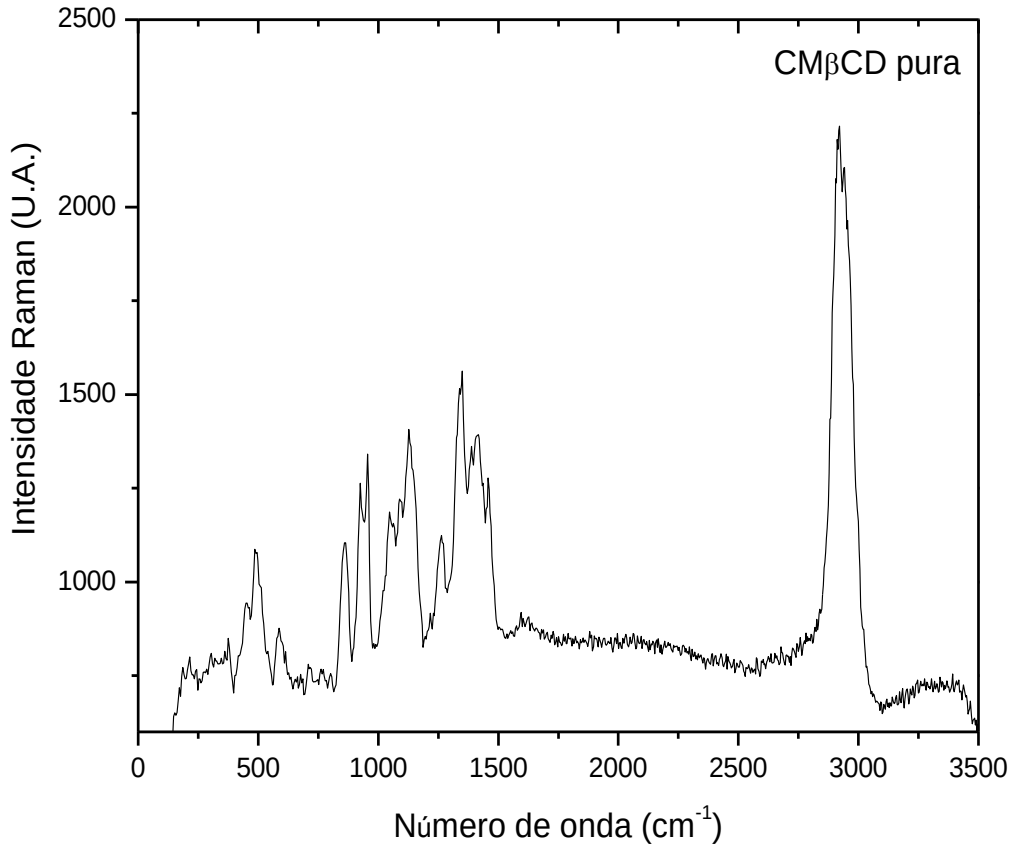


Figura 23 – Espectro FT-Raman da CMβCD pura (λ_o = 532nm)

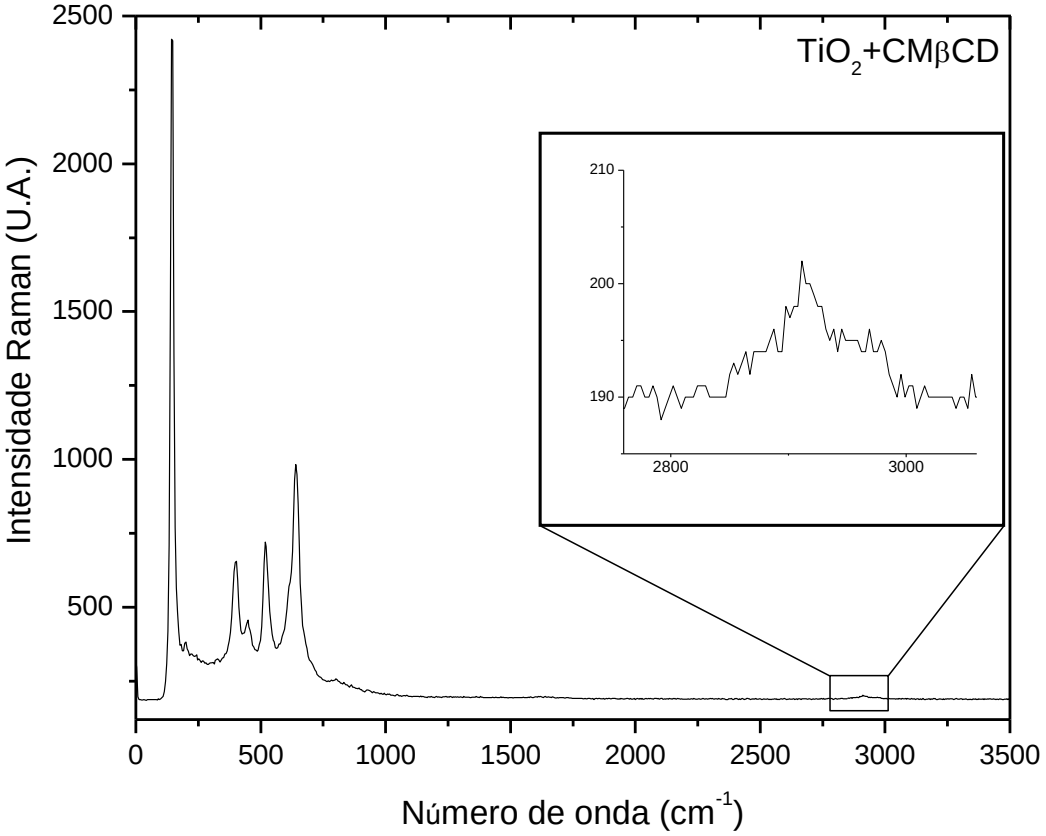


Figura 24 – Espectro FT-Raman do filme de TiO_2 modificado com CMβCD (λ_o = 532nm)

Como pode ser observado no espectro da Figura 24 acima, encontra-se em aproximadamente 2.920 cm^{-1} a banda característica do estiramento νCH atribuída à CMβCD ligada à superfície do TiO_2.

O complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ puro também foi analisado por espectroscopia Raman. No espectro da Figura 25 podem ser observadas diversas bandas intensas na região de 1.300 a 1.600 cm^{-1}. Assumpção et. al.[125] atribuiram os principais modos vibracionais do espectro deste complexo ao estiramento ν(CC, CN) + $\delta_{i.p.}$(CCH) em 1.359 cm^{-1} e 1.466 cm^{-1} e $\nu(CC)_{Brph}$ em 1.540 cm^{-1}, sendo "$\delta_{i.p.}$" a deformação angular no plano e "ν" o modo vibracional de estiramento.

É importante destacar o fenômeno Raman Ressonante que se observa no espectro devido ao fato do comprimento de onda do laser de excitação coincidir com

a da banda de absorção de uma transição eletrônica permitida, no caso uma banda de transferência de carga metal-ligante (TCML) do complexo. Por isso observa-se um grande aumento da intensidade das bandas Raman fundamentais do complexo.

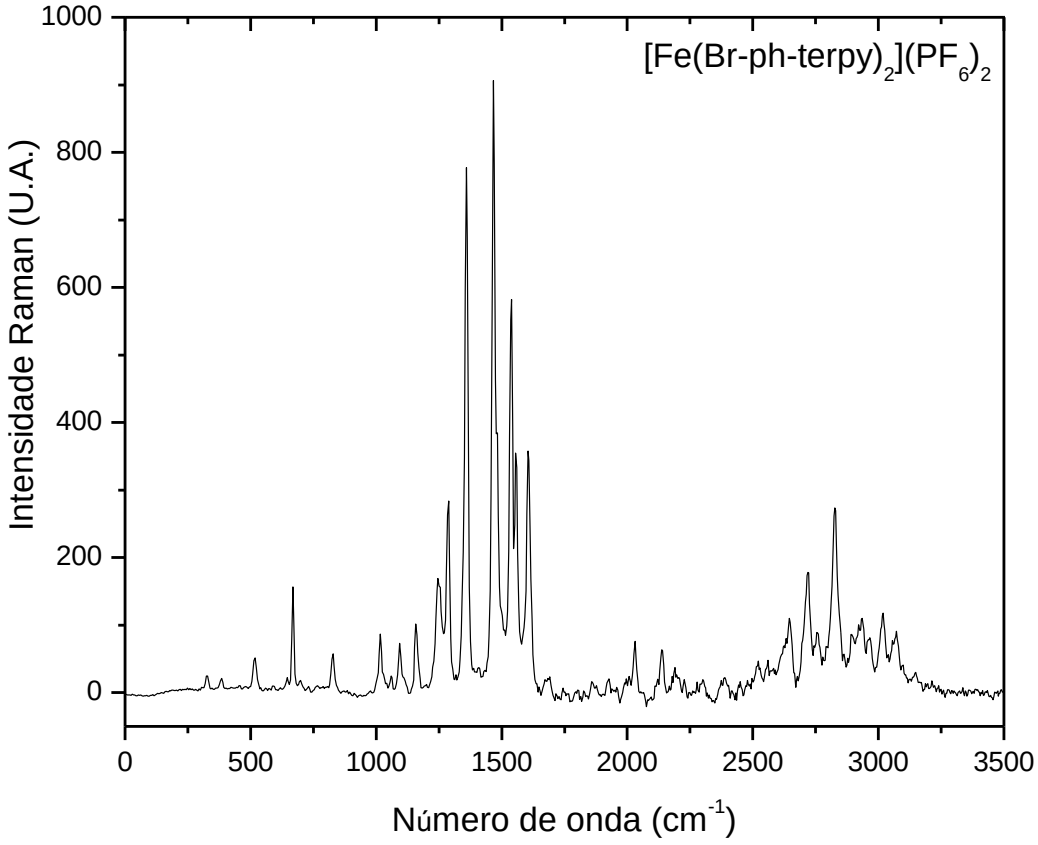


Figura 25 – Espectro FT-Raman do complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ puro (λ_o = 532nm)

O mesmo efeito Raman ressonante é responsável pela identificação da presença do complexo de ferro(II) ancorado ao filme de TiO_2 funcionalizado, mostrado na Figura 26. Note que a quantidade de CMβCD deveria ser equivalente ou maior que ao de corante, mas praticamente não aparece no espectro Raman do dosímetro UV. Neste espectro podemos observar claramente as bandas correspondentes aos modos vibracionais do TiO_2 e as bandas intensas na região de 1300 a 1600 cm^{-1} correspondentes ao complexo $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$.

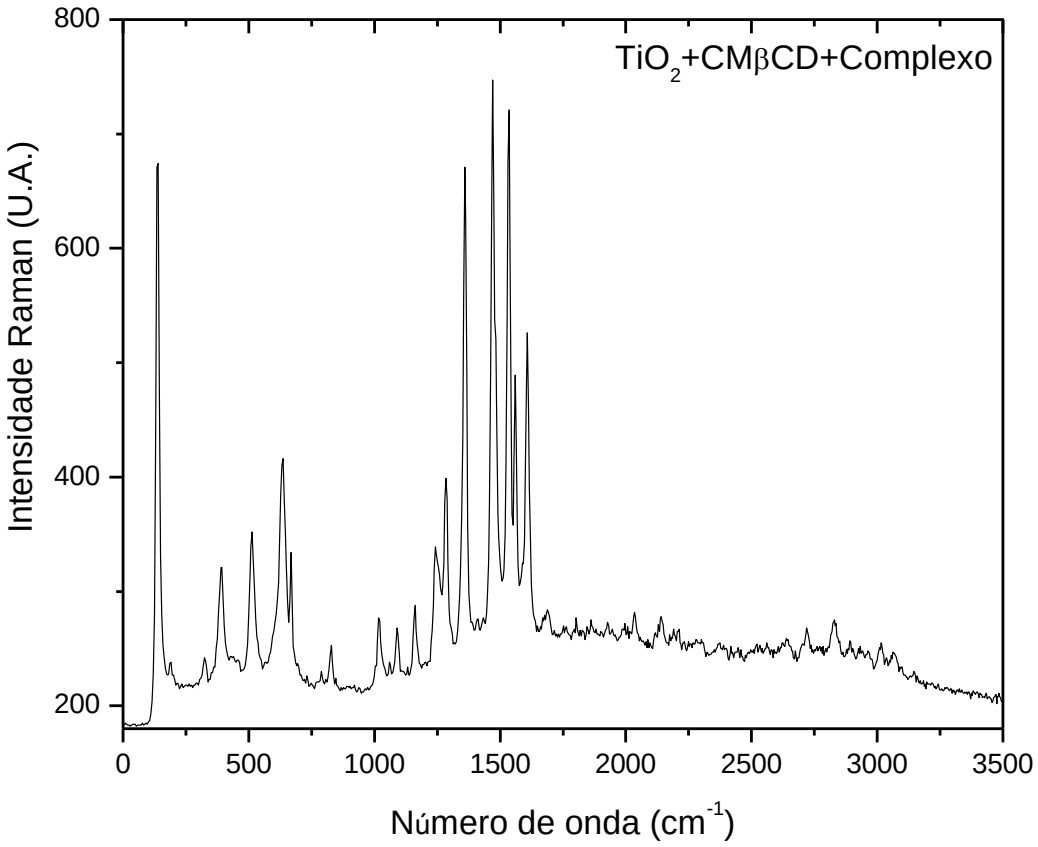


Figura 26 – Espectro FT-Raman do dosímetro UV (λ_o = 532nm)

Na Figura 27 temos os cinco espectros Raman descritos acima demonstrando a obtenção do dispositivo UV supramolecular.

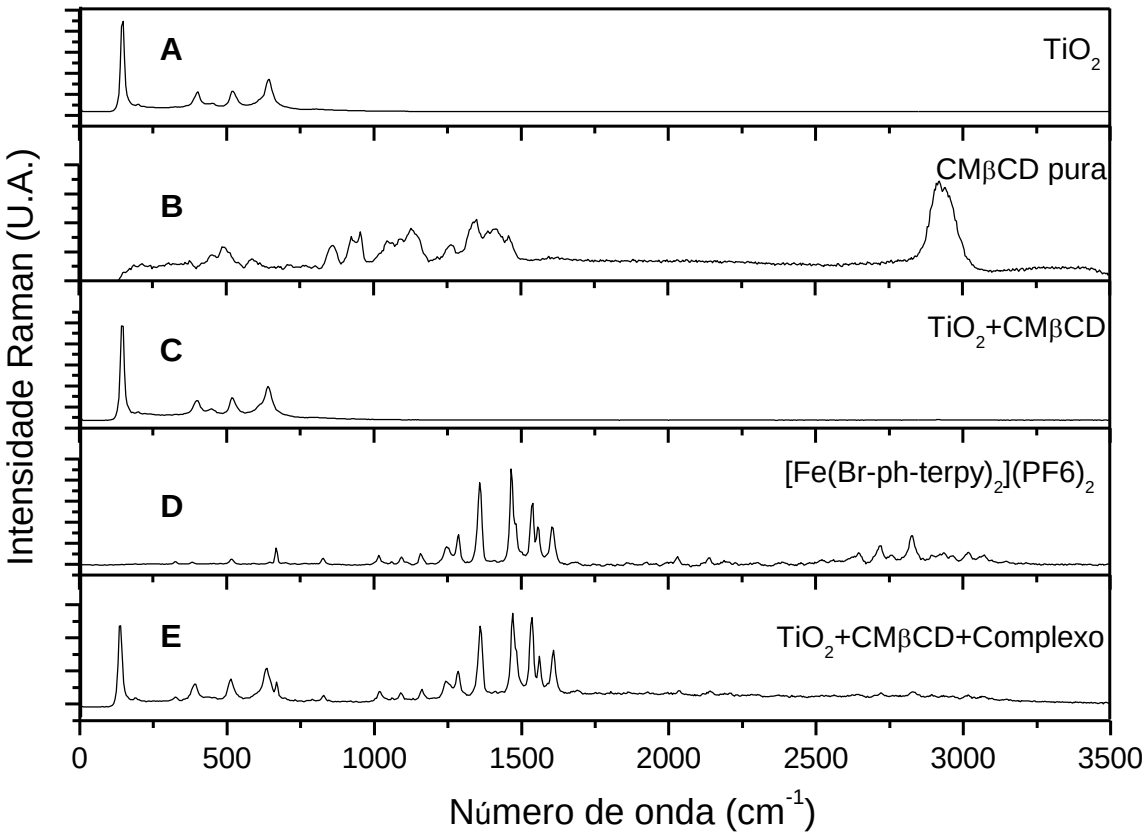


Figura 27 – Espectro Raman para: (**A**) TiO_2 puro, (**B**) CMβCD pura, (**C**) TiO_2 modificado com CMβCD, (**D**) composto $[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2](PF_6)_2$ puro, (**E**) dosímetro UV resultante da interação hóspede-hospedeiro.

4.4.4 Estudo de fotodegradação do dispositivo UV

Os ensaios de fotodegradação do dispositivo UV (TiO_2+CMβCD+$[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$) foram realizados conforme descrito no item 3.7.

Visando compreender o mecanismo envolvido no processo de fotodegradação o dispositivo foi irradiado em atmosfera de ar por 2 horas (lâmpada de xenônio, potência de 150 W) e seu espectro de absorção foi registrado continuamente a cada 30 segundos. Na presença de ar, após aproximadamente 1 hora de exposição é possível observar nitidamente a diminuição da intensidade da cor púrpura característica.

O mesmo procedimento foi adotado para a irradiação do dispositivo em atmosfera de nitrogênio. Nesta condição não foi observada a descoloração do filme.

Um terceiro experimento foi realizado irradiando-se o dispositivo em atmosfera de ar, mas desta vez utilizando apenas comprimentos de onda superiores a 400 nm. Nesta condição também não foi observada a descoloração do filme. Na Figura 28 são mostrados os resultados dos ensaios realizados.

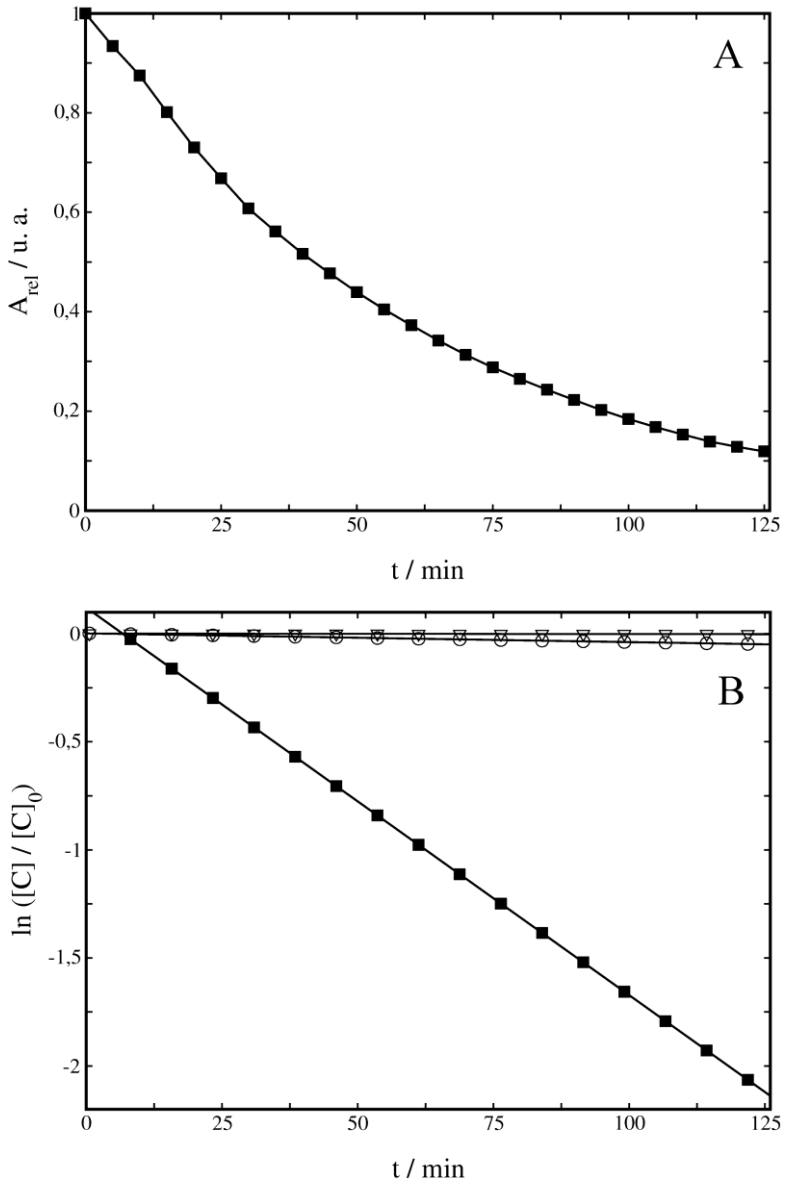


Figura 28 – **A**) Curva cinética mostrando a fotodegradação do dispositivo UV ao ar (■); e **B**) gráfico de ln (A/Ao) em função do tempo de irradiação ao ar (■), em atmosfera de nitrogênio (▼) e em atmosfera de ar e irradiação apenas com luz visível (o). Absorbâncias monitoradas no comprimento de onda de 572 nm.

Em função do exposto acima, pode-se inferir que o processo de branqueamento (*photobleaching*) se inicia com a absorção de radiação UV pelas nanopartículas de TiO_2 promovendo elétrons (e^-) da banda de valência para a banda de condução. Esse processo leva a formação de buracos (h^+) em sua banda de valência e elétrons de alta energia na banda de condução. O poder redutor desses elétrons é suficiente para promover a redução do oxigênio molecular adsorvido na superfície das partículas de TiO_2, gerando assim radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Por outro lado, os buracos formados na banda de valência tem potencial suficiente para promover a oxidação das moléculas de H_2O adsorvidas na superfície das nanopartículas de TiO_2, formando assim radicais hidroxila ($OH^\bullet$)[126,127,128].

Com os experimentos e resultados apresentados anteriormente podemos inferir que o processo de branqueamento do filme supramolecular não deve ser atribuído à transferência direta de elétron ou de energia do TiO_2 para o complexo. De fato, a degradação deve estar ocorrendo devido à reação do complexo adsorvido na partícula de TiO_2 com os radiais $OH^\bullet$ e $O_2^{\bullet -}$ fotoquimicamente formados pelo material semicondutor. Chega-se a essa conclusão pela análise dos experimentos de fotodegradação do complexo, que ocorre apenas em atmosfera de ar e sob irradiação UV. Em atmosfera inerte sob irradiação UV e/ou atmosfera de ar sob irradiação visível não foram observadas variações na intensidade da coloração do dosímetro. Portanto, para que esse processo ocorra é fundamental que se tenha uma atmosfera com umidade (H_2O) e O_2, além da excitação do filme de TiO_2 nanocristalino pela radiação ultravioleta.

5 METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DO FPS DE PREPARAÇÕES COSMÉTICAS

Nesse capítulo serão descritos os procedimentos adotados para a avaliação do Fator de Proteção Solar *in vitro* de uma série de protetores solares. Dentre os procedimentos serão detalhadas duas abordagens metodológicas, uma que contempla a avaliação visual da mudança de cor dos dosímetros UV quando expostos à radiação UV e outra que contempla a avaliação instrumental objetiva da variação de cor dos dosímetros UV quando expostos à radiação UV. Em ambos os casos as amostras estudadas possuem valores de FPS conhecidos e determinados em estudos clínicos (*in vivo*). Com isso será possível estabelecer curvas de calibração/correlação dos valores de FPS *in vitro* em função dos FPS *in vivo*.

5.1 Método #1 - FPS *in vitro* através de avaliação visual

Esta metodologia *in vitro* foi desenvolvida baseada no "International SPF Test Method 2006" previamente descrito no item 1.8.1.1, um método reconhecido e largamente utilizado baseado no emprego de voluntários em seus procedimentos. Sendo esta uma metodologia consagrada, foi desenvolvido um método similar, mas que utiliza dosímetros UV ao invés dos voluntários humanos. Assim, os voluntários foram substituídos por um conjunto constituído de pele artificial como substrato para aplicação das amostras de protetores solares e o dosímetro UV, sendo a menor descoloração perceptível e inequívoca do mesmo utilizada como o equivalente à formação do eritema em voluntários humanos. Nesse caso, as leituras podem ser realizadas imediatamente enquanto que no método *in vivo* as leituras devem ser realizadas apenas 16 a 24 horas após a irradiação.

5.1.1 Simulador Solar

Um simulador solar Multiport 601, fabricado pela Solar Light Company, Philadelphia, PA, com lâmpada de arco de xenônio, espelhos dicróicos, filtros Schott WG320 e UG11, e 6 saídas de luz independentes, foi utilizado como fonte de radiação ultravioleta nas irradiações dos dosímetros não-protegidos e protegidos com as amostras de protetores solares. As 6 saídas de luz possuem áreas circulares de irradiação de aproximadamente 0,9 cm^2, que estão dispostas em uma matriz 3 x 2 com distância entre os centros de cada saída de aproximadamente 1,6 cm e níveis de irradiância com regulagem independente.

Figura 29 – Foto do simulador solar Multiport 601 com a disposição das saídas de luz em destaque.

A intensidade de luz ultravioleta nas saídas do simulador solar foi verificada por meio de um espectroradiômetro para garantir a adequação aos limites de Eficiência Eritematosa Relativa Cumulativa (%RCEE) exigidos pela metodologia “International SPF Test Method 2006”, de acordo com a publicação “COLIPA -

Guidelines for Monitoring UV Radiation Sources"[129]. Os valores experimentais de %RCEE obtidos são apresentados na Tabela 6 a seguir. A potência de cada saída foi ajustada antes de cada irradiação utilizando-se um detector de ultravioleta eritema-efetivo PMA 2103LLG, também da Solar Light Company.

Tabela 6 - Limites de %RCEE definidos pelo International Sun Protection Factor Test Method (2006).

Faixa de comprimento de onda (nm)	**Limites de %RCEE (%)**		**%RCEE**
	Inferior	**Superior**	**Valores medidos**
< 290	< 0,1		0,0
290 a 300	1,0	8,0	6,5
290 a 310	49,0	65,0	55,9
290 a 320	85,0	90,0	89,1
290 a 330	91,5	95,5	94,7
290 a 340	94,0	97,0	96,8
290 a 400	> 99,9		100,0

5.1.2 Confecção dos Dosímetros UV

Os dosímetros UV para essa aplicação foram preparados seguindo o procedimento previamente descrito no item 4.4.1 (Preparo de Filmes de TiO_2). Para tal, placas de vidro comum de microscopia foram delimitadas com fita adesiva de forma a se obter no final do processo uma matriz 3 x 2 de modo que a área seja um pouco maior que a área de irradiação do simulador solar descrito no item 5.1.1.

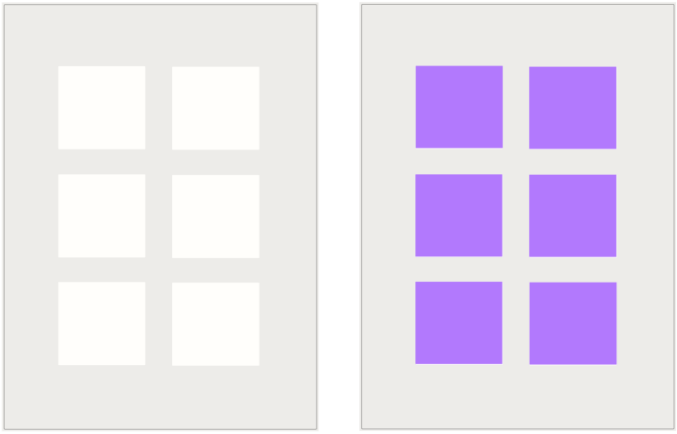


Figura 30 - Esquema mostrando um par de matrizes 3 x 2 de dosímetros UV para medida de FPS antes (esquerda) e após (direita) a incorporação do complexo. A área dos quadrados é maior que 1 cm^2 de modo que os feixes das saídas do simulador solar estejam circunscritos dentro dos mesmos.

5.1.3 Substrato

O material utilizado como substrato para aplicação das amostras de protetores solares foi a pele sintética VitroSkin® fabricado por IMS Inc., um substrato amplamente utilizado para estudos espectrofotométricos de protetores solares. Este material é constituído basicamente de proteínas endurecidas com componentes lipídicos e foi desenvolvido para conferir propriedades físico-químicas similares à pele humana como, por exemplo, topografia e rugosidade, pH, tensão superficial e força iônica. Além disso, possui alta transmitância na região do UV-Vis. As folhas de VitroSkin® foram cortadas em peças de 8 x 5 cm e tiveram suas áreas de aplicação de amostras delimitadas com lapiseira de forma a se obter uma matriz 3 x 2 perfeitamente coincidente com as matrizes do dosímetro UV e as guias de luz do simulador solar.

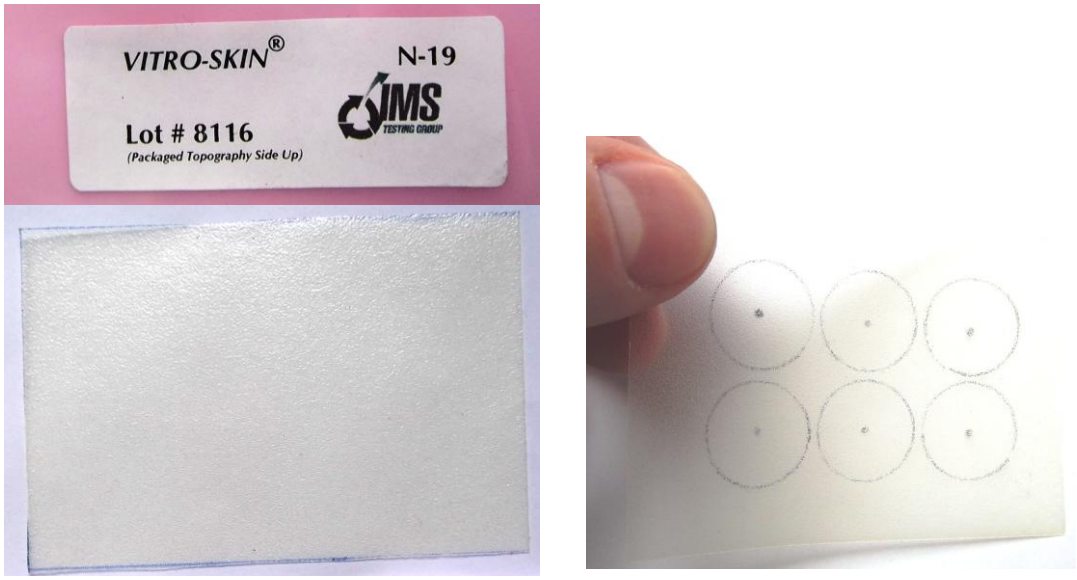


Figura 31 – Substrato – VitroSkin® de IMS. Inc. À direita o destaque da demarcação das áreas de aplicação de produtos no formato de uma matriz 3 x 2 coincidente com o posicionamento dos dosímetros e das saídas de luz do simulador solar.

5.1.4 Modo de Aplicação da Amostra Sobre o Substrato

O substrato, climatizado a 21 ºC e 55% U.R. por 24h, foi previamente demarcado em seis áreas de 1,9 cm^2 conforme a matriz 3 x 2 descrita anteriormente. Em cada uma das 6 sub-áreas foram aplicados 3,8 ± 0,2 mg da amostra-teste de modo a se ter uma concentração superficial de 2,0 mg/cm^2. A amostra foi uniformemente espalhada em cada área com o auxílio de uma ponta arredondada de um bastão de vidro para simular a extremidade dos dedos sem, contudo absorver a formulação. As áreas com a amostra-teste foram irradiadas após um tempo de secagem de 15 a 20 minutos.

5.1.5 Dosímetro/Substrato/Amostra para Medida de DMB

Um dos principais problemas para o desenvolvimento de ensaios *in vitro* é a definição da Dose Eritematosa Mínima, o parâmetro utilizado para o cálculo do FPS.

No caso dos testes com voluntários humanos, a DEM é definida como sendo a dose mínima necessária para provocar o aparecimento de eritemas com bordas bem definidas. Tendo-se em vista que a fotodecomposição do complexo $Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ presente nos dosímetros será utilizado como indicador da dose de radiação UV, uma definição análoga ao dos ensaios *in vivo* foi utilizada, inclusive para facilitar o uso do novo método por profissionais da área. Ou seja, a DEM dos ensaios *in vitro* foi convencionada como sendo a dose mínima necessária para causar um branqueamento perceptível e inequívoco a olho nu, com bordas definidas. Dessa forma estamos propondo a utilização da DMB (Dose Mínima de Branqueamento) do dosímetro UV, ou seja, a quantidade de energia radiante (é proporcional ao número de fótons) necessária para se produzir o menor branqueamento perceptível e indubitável, que nesse caso deve ser avaliado imediatamente após o término da irradiação. Assim, a Dose Mínima de Branqueamento do dosímetro protegido e não-protegido com protetor solar foram respectivamente abreviadas DMBp e DMBnp.

Séries de seis doses de radiação ultravioleta, com variação de 25% entre cada dose (progressão geométrica com razão *q*=1,25) foram empregadas para a realização dos ensaios. A fórmula usada para calcular as doses de radiação UV foi:

$$D = 1{,}25^{n} \text{ x } DMBnp \times FPSesp \qquad \text{Eq. 10}$$

Sendo,

D: Dose UV incidente;

n: Os números inteiros 2, 1, 0, -1, -2, -3 para as doses de 1 a 6, respectivamente;

DMBnp: Dose Mínima de Branqueamento para o dosímetro não-protegido;

FPSesp: Fator de proteção solar esperado do produto testado (igual a 1 para a pele desprotegida).

A irradiância na 6ª saída de luz do simulador solar foi fixada em 1,67 MED.min^{-1} (equivalente a 82,0 mW.cm^{-2}) utilizando-se o detector de ultravioleta eritema-efetivo PMA 2103LLG (Solar Light Co.). Em seguida, as outras 5 saídas de luz foram ajustadas para 1,32 ; 1,06 ; 0,85 ; 0,68 e 0,54 MED.min^{-1} (equivalentes a 66,0 ; 53,0 ; 42,0 ; 33,5 e 27,0 mW.cm^{-2}), de acordo com a progressão geométrica de potência desejada.

Ao se trabalhar com uma série geométrica fixa de irradiâncias como a estabelecida acima, a exposição UV passa a ser feita apenas pelo controle do tempo de irradiação, o que simplifica e minimiza possíveis erros experimentais.

Na Figura 32 são mostradas fotos que ilustram os experimentos realizados utilizando-se o conjunto VitroSkin®+Dosímetro posicionado sob as saídas de luz do simulador solar. Neste exemplo podemos observar claramente o gradiente de intensidade de branqueamento conforme o aumento da irradiância UV nas saídas de luz. De acordo com a definição aqui proposta, a DMB (Dose Mínima de Branqueamento) nesse caso deve ser aquela da saída número 3.

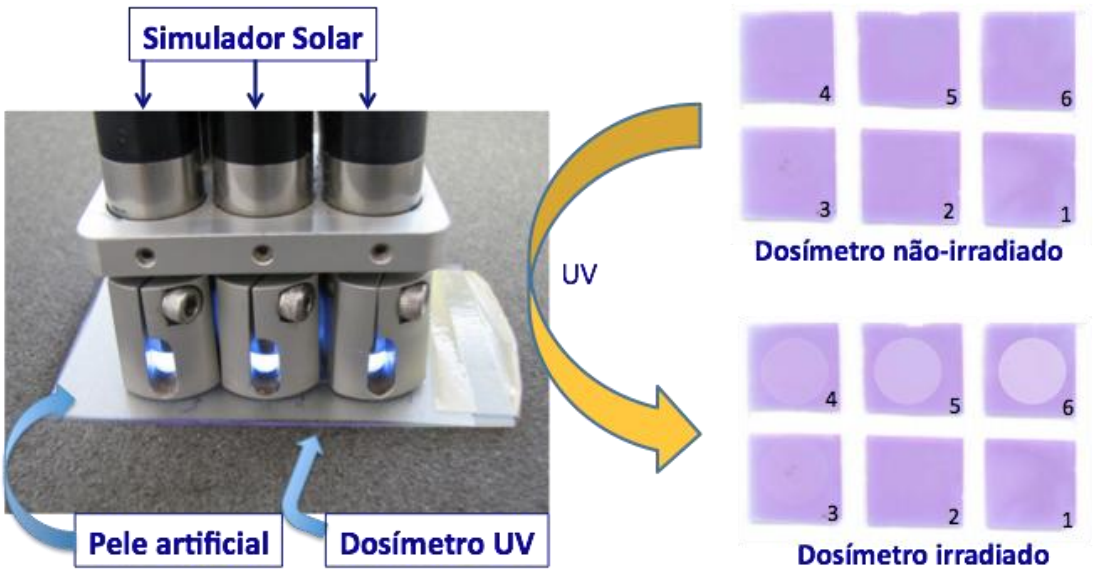


Figura 32 – Foto mostrando a montagem utilizada nos ensaios (esquerda), e a matriz de dosímetros antes e após a irradiação UV com doses crescentes nas saídas de luz de 1 a 6.

5.1.6 Determinação *in vitro* do FPS de Protetores Solares

Os primeiros experimentos de determinação *in vitro* do *FPS* foram realizados com protetores solares gentilmente fornecidos pela empresa Natura Inovação de Tecnologia de Produtos Ltda. Foram utilizadas 6 amostras de protótipos de protetores solares cujos valores de FPS foram determinados *in vivo* através da metodologia “International SPF Test Method 2006”.

A primeira etapa dos experimentos foi o estudo de otimização e determinação da Dose Mínima de Branqueamento do sistema VitroSkin®+Dosímetro não-protegido (DMBnp). Para isso, a progressão geométrica de irradiâncias foi fixada em 82,0 ; 66,0 ; 53,0 ; 42,0 ; 33,5 e 27,0 $mW.cm^{-2}$, respectivamente para as saídas de luz número 6, 5, 4, 3, 2 e 1 do simulador solar. O tempo de irradiação necessário para a produção da DMBnp em algum ponto entre as saídas número 2 e 5 do simulador solar foi de 88 ± 13 segundos, ou seja, a progressão de doses UV no sistema VitroSkin®+Dosímetro não-protegido foi de 7,22 ; 5,81 ; 4,66 ; 3,70 ; 2,95 e 2,38 $J.cm^{-2}$ para as saídas de luz número 6, 5, 4, 3, 2 e 1, respectivamente. A DMBnp determinada como a média de 11 ensaios em replicata foi igual a 3,95 ± 0,86 $Joules.cm^{-2}$.

As amostras de protetores solares aplicadas nos substratos foram irradiadas com doses UV calculadas conforme a Eq. 10, sendo todas as amostras avaliadas em triplicata. O Fator de Proteção Solar *in vitro* ($FPS_{in\ vitro}$) foi determinado pela relação entre as doses mínimas de branqueamento dos dosímetros irradiados com os substratos protegidos e não-protegidos pelas amostras de protetor solar ($FPS_{in\ vitro}=DMB_p/DMB_{np}$). Os resultados obtidos para a série de protetores solares estudados são listados na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados de FPS *in vivo*, DMB e FPS *in vitro* determinados para uma série de amostras de protetores solares.

Cód. amostra	FPS *in vivo*	DMBnp ($J.cm^{-2}$)	DMBp ($J.cm^{-2}$)	FPS *in vitro* DMBp/DMBnp
Protetor BDP9	9,10 +/- 1,46	3,95 +/- 0,86	13,66 +/- 3,24	3,44 +/- 0,82
Protetor BDP15	15,90 +/- 2,23		41,83 +/- 4,52	10,59 +/- 1,15
Protetor BDP30	33,20 +/- 5,64		107,83 +/- 12,00	27,30 +/- 3,04
Protetor BDP15	17,00 +/- 2,21		48,48 +/- 2,17	12,27 +/- 0,55
Protetor BDP20	21,20 +/- 3,60		78,87 +/- 0,62	19,97 +/- 0,16
Protetor BDP30	30,30 +/- 4,70		138,37 +/- 29,29	35,03 +/- 7,20

Os dados da Tabela 7 podem ser melhor analisados graficamente, ou seja, correlacionando os valores de FPS *in vitro* e os *in vivo*, considerando-se o conjunto de amostras de protetores solares. Uma boa correlação linear foi obtida, como mostrado na Figura 33, tendo sido encontrado uma inclinação da reta de ajuste linear igual a 0,74 e um coeficiente de correlação linear R^2 igual a 0,899, consistente com uma elevada aderência dos resultados à regressão linear calculada. Este resultado indica que o método baseado na avaliação visual do DMB é satisfatório para a determinação de valores relativos de FPS. Além disso, é um bom indicativo de que o branqueamento dos dosímetros se correlaciona linearmente com a formação de eritemas, um processo muito mais complexo e dependente de fatores dinâmicos e das características individuais dos voluntários.

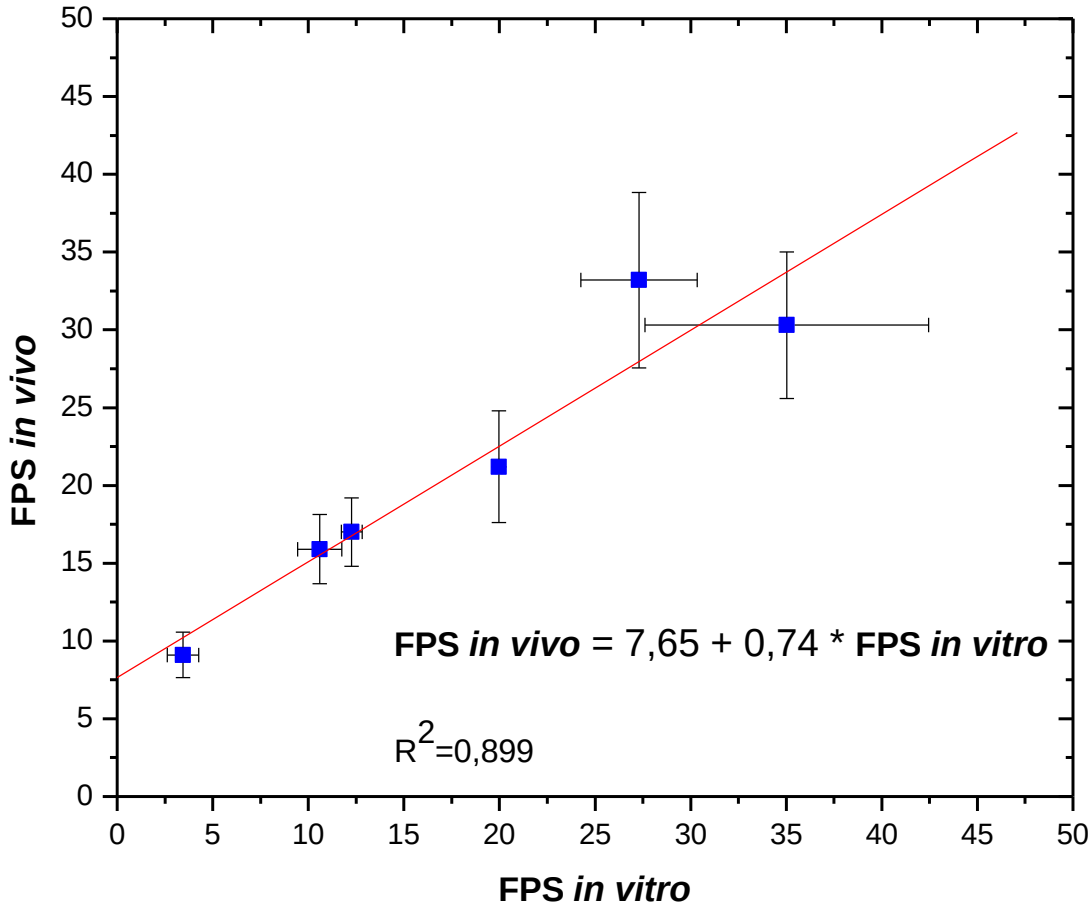


Figura 33 – Gráfico da correspondência entre os valores de FPS determinados *in vivo* e *in vitro* por avaliação visual dos DMBs.

5.2 Método #2 - FPS *in vitro* através de avaliação instrumental

Os resultados acima descritos nos motivaram a tentar desenvolver um método instrumental de avaliação dos FPSs onde a determinação da DMB seria realizada espectrofotometricamente. Tal iniciativa visa diminuir a subjetividade do processo e também a possibilidade de automação, tornando as medidas muito mais rápidas e precisas.

Considerando-se que o método visual se baseia na variação da intensidade de coloração dos dosímetros UV, poder-se-ia utilizar a diferença de absorbância antes e após a irradiação. Todavia, tal estratégia não permite o uso dos dados coletados durante o processo de fotobranqueamento, além dos erros inerentes a não homogeneidade do dosímetro poderem ser relativamente grandes. Nesse caso, seria necessário o uso de um mesmo tempo de irradiação para todas as amostras, de preferência usando a progressão geométrica correspondente. Assim, imaginou-se a possibilidade de se utilizar um outro parâmetro que se correlaciona com o fluxo de fótons, considerando-se que o fotobranqueamento é diretamente proporcional à dose eritematosa mínima. A abordagem escolhida para a avaliação instrumental *in vitro* do FPS foi o monitoramento em tempo real do decaimento da banda MLCT do complexo de ferro do dosímetro UV em função do tempo de irradiação. Nesse caso, também poderia se variar a potência de luz UV incidente e utilizar o coeficiente angular do gráfico entre a constante de velocidade de branqueamento em função da irradiância. Todavia, uma abordagem mais simples, baseado no uso de uma única irradiância, foi utilizada para o desenvolvimento desta dissertação. Por outro lado, verificou-se que a montagem de um arranjo experimental utilizando um espectrofotômetro convencional seria relativamente complicada, tendo-se em vista o espaço disponível e o arranjo definido. Por isso foi montado um arranjo de tal forma

a se ter em linha uma fonte de radiação UV-Vis, o substrato VitroSkin®, o dosímetro UV e a sonda de fibra ótica do espectrofotômetro FieldSpec®. Os detalhes experimentais são apresentados a seguir.

5.2.1 Simulador Solar

Um Simulador solar Singleport 16S-150, fabricado pela Solar Light Company, Philadelphia, PA, com lâmpada de arco de xenônio de 150 W e equipado com um espelho dicróico e um filtro Schott WG320 de 1,0 mm de espessura, com uma única saída de luz frontal foi utilizado como fonte de radiação ultravioleta para a irradiação dos dosímetros através do substrato VitroSkin® não-protegidos ou protegidos com as amostras de protetores solares. No ponto focal da radiação, à cerca de 5 cm da saída do simulador solar, a área circular irradiada é de aproximadamente 2 cm^2, sendo adequado para os ensaios com os dosímetros. Todavia, o monitoramento do processo de branqueamento do complexo de ferro(II) deve ser realizado na banda MLCT, ou seja, em torno de 572 nm. Assim, o filtro Schott UG11 presente no simulador solar foi intencionalmente removido com o objetivo de se permitir a passagem da luz visível, fundamental para as medidas espectrofotométricas do dosímetro nessa região do espectro. Vale ressaltar que a qualidade espectral na região do UVA/UVB não sofreu alterações significativas em função da retirada deste filtro Schott UG11. Além disso, o dosímetro não deve responder aos fótons da região do visível, como mostrado anteriormente, para que essa estratégia possa ser empregada com sucesso.

Figura 34 - Simulador solar Singleport 16S-150 utilizado nos ensaios.

A qualidade espectral de emissão do simulador solar foi verificada usando um espectroradiômetro para garantir a adequação aos limites de Eficiência Eritematosa Relativa Cumulativa (%RCEE) exigidos pela metodologia “International SPF Test Method 2006”, de acordo com a publicação da COLIPA “Guidelines for Monitoring UV Radiation Sources[129]. Os valores experimentais de %RCEE obtidos estão dentro dos limites estabelecidos pela norma.

A potência da saída de luz foi ajustada antes de cada irradiação por meio de um detector de ultravioleta eritema-efetivo PMA 2103LLG, também da Solar Light Company.

5.2.2 Substrato e aplicação das amostras

O material utilizado como substrato para aplicação das amostras de protetores solares nesse caso também foi a pele sintética VitroSkin® fabricada por IMS Inc. As folhas de VitroSkin® foram cortadas em peças circulares de 2,0 cm^2 que foram fixadas em um suporte metálico para melhor padronização da aplicação das amostras.

Figura 35 – Substrato VitroSkin® cortado em disco de 2 cm^2 e fixado em suporte metálico para aplicação da amostra de protetor solar.

O substrato cortado na forma de discos de 2,0 cm^2, climatizado a 21 ºC e 55% U.R. por 24h, recebeu a amostra-teste na quantidade de (2,0 ± 0,1) mg, correspondendo a 1,0 mg/cm^2. A amostra foi uniformemente espalhada com o auxílio de uma ponta arredondada de um bastão de vidro para simular a extremidade dos dedos sem, contudo, absorver a formulação. As áreas com a amostra-teste foram irradiadas após um tempo de secagem de 15 a 20 minutos.

5.2.3 Monitoramento Instrumental

As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se a montagem descrita na Figura 36. Note que a saída de luz do simulador solar e a sonda de fibra óptica do espectrofotômetro FieldSpec® foram posicionados em linha, sendo que o substrato VitroSkin® e o dosímetro UV se encontram entre eles e orientados

perpendicularmente em relação a direção do feixe, de modo a minimizar os efeitos de espalhamento na medida. Pode-se notar que analogamente as medidas com avaliação visual, o substrato com o protetor solar foi posicionado de modo a filtrar/atenuar a intensidade da radiação UV incidente sobre o dosímetro. A irradiância incidente no dosímetro UV foi ajustada e fixada em 12 $mW.cm^{-2}$.

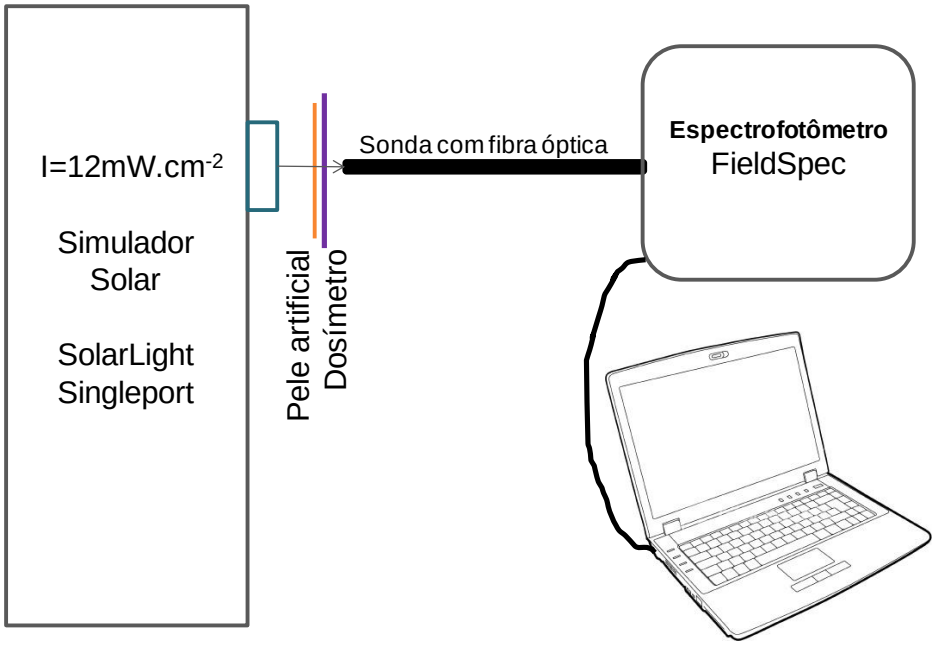


Figura 36 – Esquema mostrando o arranjo experimental utilizado para a determinação do FPS através de medidas espectrofotométricas.

Foi realizado o monitoramento da variação da banda de absorção do dosímetro na região do visível, mais especificamente no comprimento de onda de 572 nm, em função do tempo de irradiação (irradiância fixada em 12 $mW.cm^{-2}$). Os espectros foram registrados a cada 30 segundos por períodos de até 90 minutos. Durante estes experimentos a temperatura e a umidade do ar foram mantidas constantes a 22 ºC e 55%.

Os dados foram coletados em um espectrofotômetro de fibra óptica em modo transmitância (fibra óptica posicionada logo depois do dosímetro UV). Na

Figura 37 é apresentado um exemplo de variação espectral ao longo do tempo de exposição UV para um dispositivo coberto com VitroSkin® sem protetor solar.

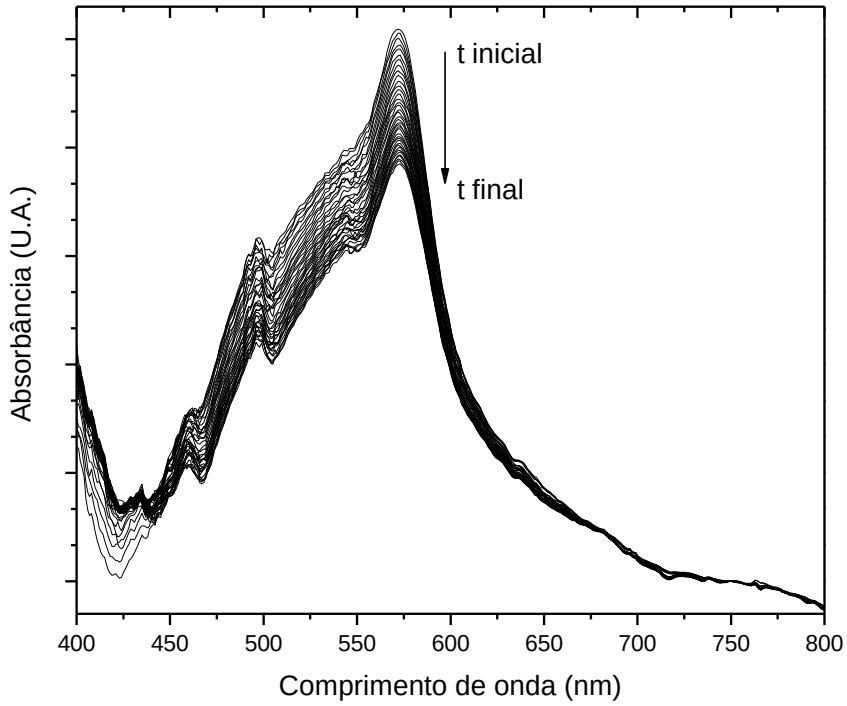


Figura 37– Exemplo da variação espectral do dosímetro UV coberto com VitroSkin® não-protegida em função do tempo de exposição UV.

5.2.4 Determinação *in vitro* do FPS por medida instrumental

Estes experimentos foram realizados com protetores solares gentilmente fornecidos pela empresa Johnson & Johnson do Brasil. Foram utilizadas 15 amostras de protetores solares cujos valores de FPS foram determinados *in vivo* através da metodologia “International SPF Test Method 2006”.

As amostras de protetores solares foram avaliadas em triplicata seguindo os procedimentos de aplicação, irradiação e monitoramento previamente descritos. Monitorando-se a absorbância em 572 nm em função do tempo de irradiação, foi possível construir gráficos de variação de absorbância em função do tempo de exposição. Na Figura 38 são mostradas curvas cinéticas de decaimento típicas

registradas para amostras de protetores solares com diferentes valores de FPS (1; 9; 15; 30; 50; 60).

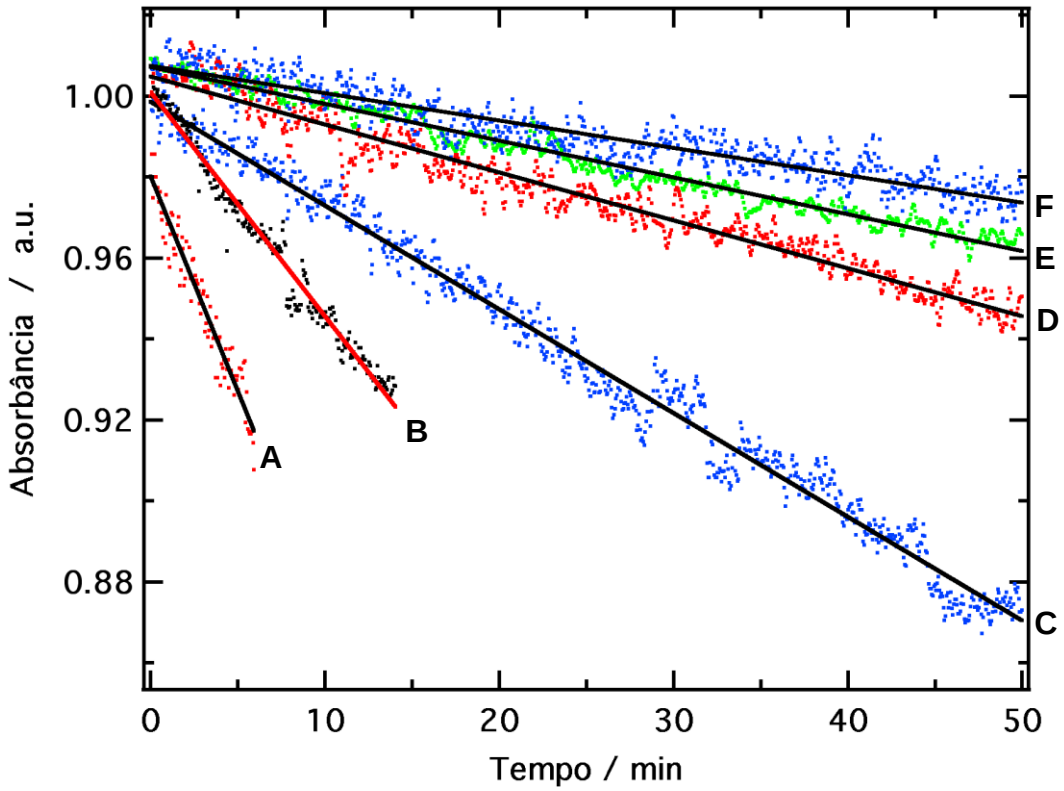


Figura 38 – Curvas cinéticas do processo de descoloramento inicial dos dosímetros UV de TiO_2 nanocristalino: A) sem protetor solar, e com protetores solares com FPS iguais a B) 9, C) 15, D) 30, E) 50 e F) 60. As retas correspondem às regressões lineares.

Pode-se verificar (Figura 38) que o decaimento inicial é tipicamente linear, como esperado, sendo o coeficiente angular dependente do FPS. Além disso, verifica-se um ruído de amplitudes mais ou menos significativas da absorbância. De fato, os dados experimentais aparecem com um ruído de fundo, cuja amplitude relativa tende a aumentar a medida que o FPS_i aumenta. Também, podem ser verificadas oscilações mais lentas e flutuações repentinas que provocam a mudança da linha base de um conjunto significativo de pontos, para depois retornar a linha base inicial. Tendo-se em vista que o arranjo experimental foi mantido fixo e um

espectrofotômetro de alta sensibilidade e estabilidade foi utilizado para realizar os experimentos, tais problemas podem ser associados principalmente as flutuações e oscilações do fluxo de radiação entregue pelo simulador solar em função do tempo. Esse comportamento não era esperado tendo-se em vista que se trata de um sistema de irradiação de alta estabilidade, mas explica as flutuações observadas tendo-se em vista que a radiação visível da fonte também está sendo utilizada para monitorar a variação de absorbância em 572 nm. Isso também explica a tendência de aumento desse ruído em função da diminuição do coeficiente angular e consequente aumento do tempo de monitoramento. Assim, o uso de fontes de radiação mais estáveis aumentaria a exatidão, principalmente no caso de fatores de proteção solar de protetores com FPSs maiores que cerca de 20, de acordo com a Figura 38.

É interessante observar que, por menor que seja o FPS da amostra em análise, a variação da absorbância ao longo do tempo é equivalente à algo em torno de 0,10 unidades de absorbância. Isso pode ser explicado pelo fato da irradiação dos dispositivos estar sendo realizado pela frente do filme de TiO_2 e a sonda do espectrofotômetro ter sido posicionado na parte de trás do dosímetro UV. Como o filme de TiO_2 é um excelente agente de reflexão e espalhamento, a intensidade da radiação UV diminui rapidamente em função da profundidade. Assim, a fotodegradação do complexo de Fe(II) adsorvido ocorre principalmente na superfície, ocorrendo em menor extensão nas camadas mais profundas do filme de TiO_2. Assim, a coloração residual relativamente alta se deve a presença de complexo não decomposto próximo a interface TiO_2/vidro, justificando os resultados obtidos.

A curva correspondente ao substrato não-protegido é a que apresenta o maior coeficiente angular, pois neste caso o substrato VitroSkin® sem protetor foi

posicionado entre o simulador solar e o dosímetro UV. Logo, o fluxo de radiação UV que atinge o dosímetro é o máximo possível, ou seja, o número de fótons que alcança o dosímetro em função do tempo é máximo, provocando um descoloramento mais rápido. Todavia, à medida que o FPS do protetor solar vai aumentando, o fluxo de fótons que efetivamente chega ao dosímetro diminui proporcionalmente, tornando o processo de descoloramento mais lento e, consequentemente, diminuindo o coeficiente angular do gráfico da absorbância em função do tempo.

Sabe-se que o branqueamento/descoramento é proporcional ao fluxo de fótons, que por sua vez é diretamente proporcional à dose, ou seja, ao produto do fluxo de radiação UV e o tempo de irradiação. Logo, o parâmetro que deve se correlacionar com os valores de FPS_i é o coeficiente angular das curvas cinéticas, ou seja, as constantes de velocidade de branqueamento observadas.

Os resultados obtidos para a série de protetores solares estudados são listados na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados de FPS *in vivo* e Velocidades de branqueamento/descoramento (monitoramento da absorbância em 572 nm) determinados para uma série de amostras de protetores solares.

Cód. amostra	**FPS *in vivo*** (média +/- d.p.)	**Velocidade de branqueamento** (média +/- d.p.) $x10^{-3}$ $A.min^{-1}$
N.P.	1,0	23,4 +/- 4,9
44	4,4 +/- 0,7	18,2 +/- 1,0
71	7,1 +/- 1,1	10,3 +/- 0,1
103	10,3 +/- 1,8	13,2 +/- 2,1
150	15,0 +/- 2,3	6,0 +/- 0,7
174	17,4 +/- 2,8	5,8 +/- 0,2
300	30,0 +/- 5,2	3,4 +/- 0,1
308	30,8 +/- 3,4	2,1 +/- 0,4
450	45,0 +/- 7,9	1,6 +/- 0,1
500	50,0 +/- 7,8	2,0 +/- 0,5
600	60,0 +/- 10,1	1,3 +/- 0,1
652	65,2 +/- 8,1	1,1 +/- 0,3
700	70,0 +/- 15,0	1,0 +/- 0,1
400	40,0 +/- 6,1	1,6 +/- 0,4
200	20,0 +/- 3,2	2,8 +/- 0,3
680	68,0 +/- 10,2	1,1 +/- 0,3

De fato, uma excelente correlação exponencial pode ser observada entre as velocidades de branqueamento (constantes cinéticas, k_i) e os valores de FPS_i, como mostrado na Figura 39 a seguir.

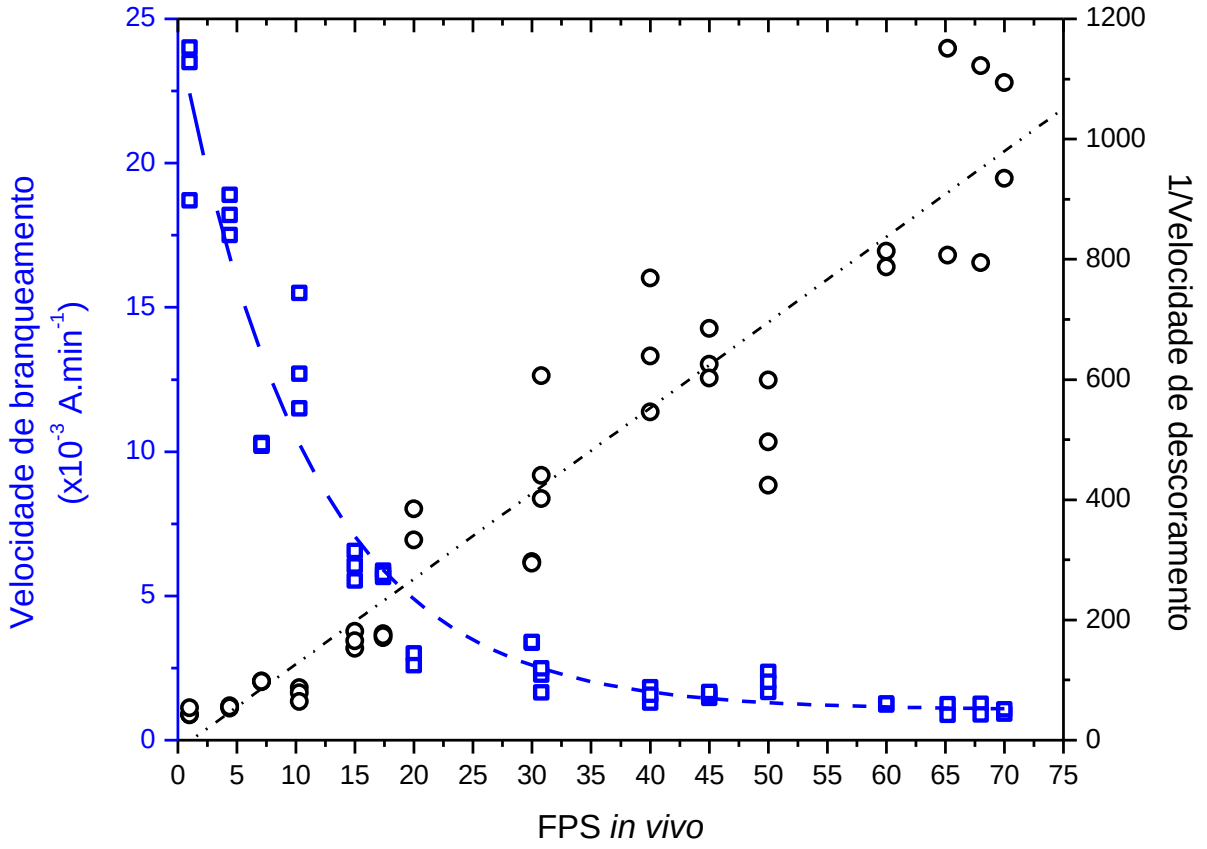


Figura 39 – Gráfico das constantes de velocidade iniciais de branqueamento/descoramento em função dos valores de FPS *in vivo* (eixo da esquerda, quadrados em azul). Gráfico do recíproco das constantes de velocidade em função dos valores de FPS *in vivo* (eixo da direita, circulos em preto).

A análise gráfica nos permite correlacionar o FPS *in vivo* conhecido para uma série de amostras com as suas respectivas velocidades de branqueamento/descoramento. Por outro lado, verificou-se que não são as constantes de velocidade de branqueamento, mas sim as recíprocas das constantes de velocidade que se correlacionam diretamente com os valores de FPS_i *in vivo*. De fato, o gráfico de $1/k_i$ em função do FPS apresenta uma excelente correlação linear com os valores de FPS *in vivo*, como mostrado pela linha tracejada em preto na Figura 39 acima. Um coeficiente de correlação linear R^2 igual a 0,935 foi encontrado para esse conjunto de dados, apontando para uma elevada aderência dos resultados à regressão linear calculada. Este resultado indica que o método baseado

na avaliação instrumental permite que se realize previsões sobre os valores absolutos de FPS de preparações cosméticas. A análise gráfica nos permite estabelecer a seguinte equação de correspondência entre FPS *in vivo* e constante de velocidade:

$$FPS_{in\ vivo} = \frac{6{,}454.10^{-2}}{Veloc.Branq.} + 3{,}45 \qquad \text{Eq. 11}$$

Com o objetivo de se verificar a reprodutibilidade no processo de análise, um segundo investigador foi selecionado para repetir os procedimentos descritos acima de forma independente. Uma maneira de se apresentar e comparar os resultados relativos de cada investigador é através da análise gráfica dos parâmetros “FPS *in vivo*” *versus* o “recíproco da constante de velocidade”. Na Figura 40 a seguir temos a representação gráfica dos resultados obtidos pelos dois investigadores independentes.

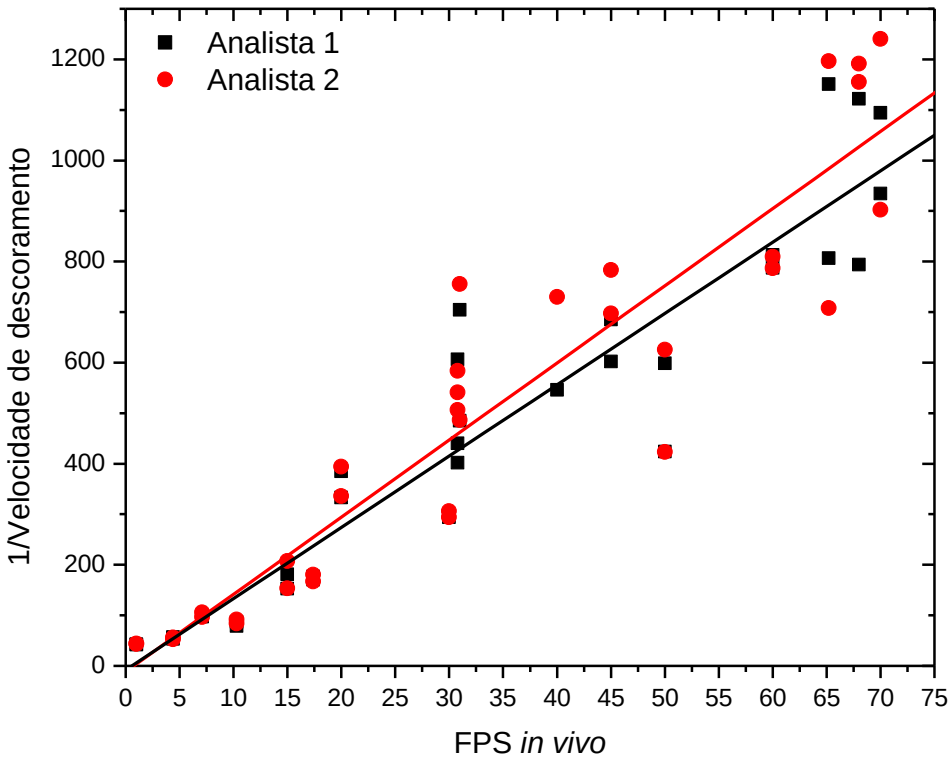


Figura 40 – Gráfico do recíproco das constantes de velocidade em função dos valores de FPS *in vivo*. Comparativo de resultados obtidos por dois analistas independentes.

Para as avaliações estatísticas foram feitos testes de comparação de médias para dados emparelhados (amostras pareadas), quando os resultados das duas amostras são relacionados dois a dois, de acordo com algum critério que fornece uma influência entre os vários pares e sobre os valores de cada par (no nosso caso, esse critério de influência é o FPS *in vivo* de cada amostra). Para observações emparelhadas, ou amostras pareadas, a avaliação apropriada para a diferença entre duas médias consiste em testar a hipótese nula de que a média das diferenças na população seja zero (t-*student* 95%).

Dentro do intervalo de confiança de 95%, a diferença das médias entre as duas populações não foi significantemente diferente em relação ao teste de hipótese nula (d=0). Tal resultado demonstra que se houver uma boa transferência de procedimentos de análise, é esperado que se observe grande similaridade de resultados entre diferentes investigadores. Nota-se que os resultados de ambos foram muito similares (Figura 40), demonstrando uma boa robustez do método.

Posteriormente à estes estudos foram realizados ensaios com 3 amostras cujos FPSs *in vivo* nos foram revelados apenas após os cálculos de previsão de FPS obtidos pelo emprego da Equação 11 (estudo cego). O resumo destes resultados está descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de Velocidades de branqueamento (Absorbância em 572 nm) e previsão do FPS *in vivo* determinados em um estudo cego.

Amostra	**Velocidade de branqueamento** (média +/- d.p.) $x10^{-3}$ $A.min^{-1}$	**Previsão do FPS *in vivo*** (média +/- d.p.) *Calculado através da Equação 11*	**FPS *in vivo* real** (média +/- d.p.) *Dados fornecidos após os ensaios*
Amostra cega 1	1,6 +/- 0,4	45,9 +/- 10,2	40,0 +/- 6,1
Amostra cega 2	2,8 +/- 0,3	26,6 +/- 2,3	20,0 +/- 3,2
Amostra cega 3	1,1 +/- 0,3	65,3 +/- 15,0	68,0 +/- 10,2

Na Figura 41 é mostrado o gráfico que correlaciona os valores reais de FPS com os valores previstos pelo modelo desenvolvido e aplicado na Equação 11. De forma geral estes resultados demonstram um bom ajuste do modelo, com 100% de acerto em termos da classificação das amostras em função do FPS, bem como do próprio FPS já que em dois casos os valores reais e previstos se encontram dentro dos mesmos intervalos de variação. Mesmo no caso onde o FPS previsto foi de 26,6 (±2,3) *versus* um valor real de 20,0 (±3,2), pode-se dizer que a previsão foi bastante satisfatória se considerarmos as variáveis e incertezas presentes nos estudos *in vivo* como efeitos de sazonalidade e diferenças interlaboratoriais.

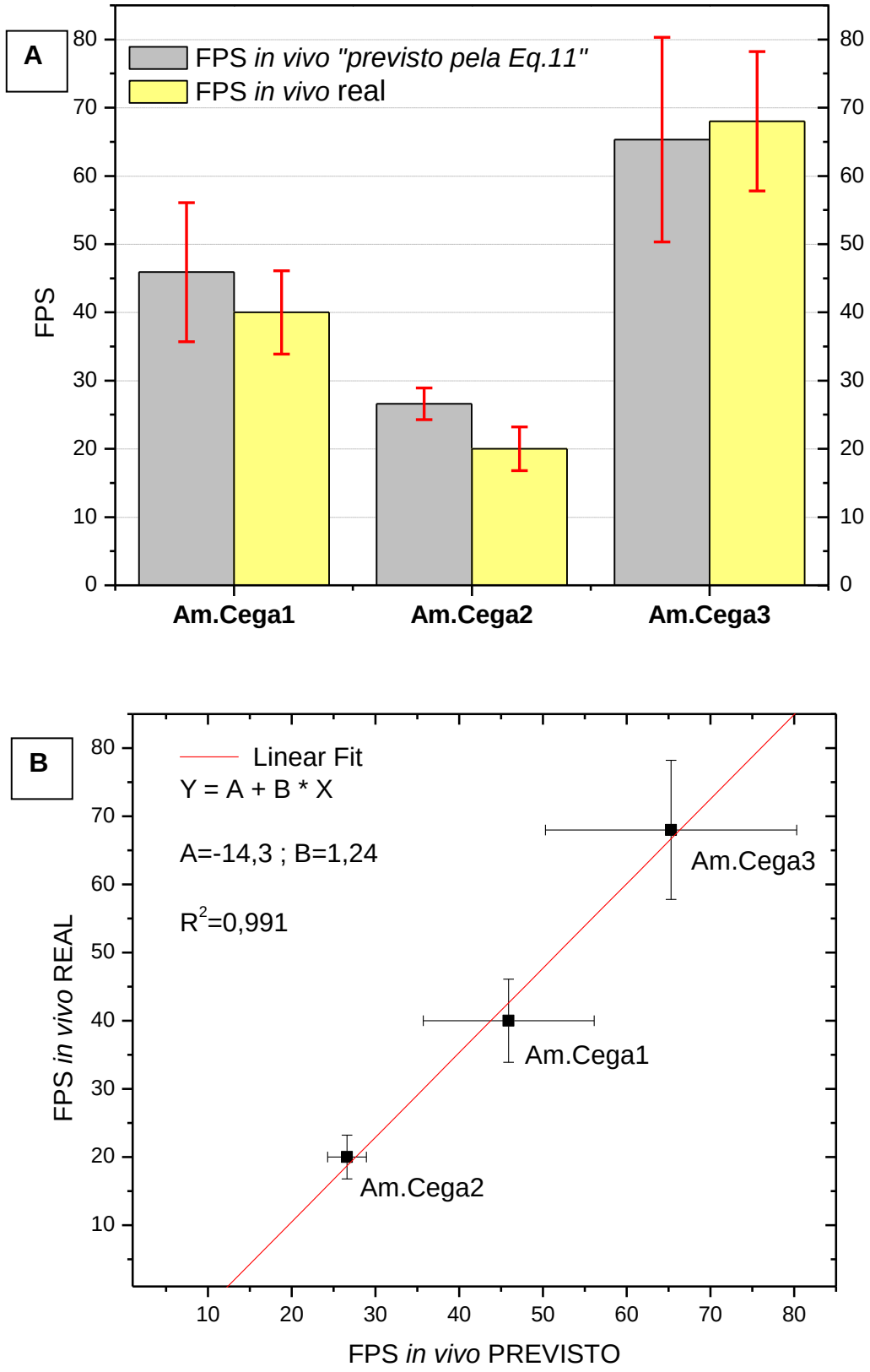


Figura 41 – (**A**) Gráfico de barras com os valores Reais e Previstos do FPS obtidos em um estudo cego. (**B**) Gráfico da correspondência de valores Reais *versus* Previstos do FPS obtidos em um estudo cego, demonstrando a linearidade entre os mesmos.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas observações a respeito das metodologias apresentadas merecem destaque. Comparando-as com outros métodos encontrados na literatura e com o próprio método Internacional, é possível destacar suas vantagens e desvantagens. Os métodos desenvolvidos são inéditos, não-invasivos e de custos relativamente baixos, constituindo-se em valiosas ferramentas para determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas. Além disso, o método instrumental, assim como o método visual, apresentaram resultados com muito boa correlação com os resultados *in vivo*. Isso possibilitou a utilização dos gráficos de FPS *in vivo versus* FPS *in vitro* como curvas de correlação para a determinação dos valores de FPS de formulações cosméticas. É interessante notar que as recíprocas das constantes cinéticas de branqueamento do complexo nos dosímetros apresentaram boa correlação com os valores de FPS, sugerindo que a irradiância UV efetiva (aquela que atinge a pele ou o dosímetro) é diretamente proporcional ao descoramento e ao aparecimento de eritemas (DEM). Esse fato, e a boa exatidão dos métodos desenvolvidos, foram confirmados pelos resultados do estudo cego realizado com três amostras de protetores solares, onde os valores de FPS encontrados foram muito satisfatórios e consistentes com os valores reais.

Essa exatidão pode ser melhorada realizando-se um maior número de ensaios, inclusive variando-se a irradiância, de modo a gerar dados de maior confiabilidade e menor erro. Além disso, a instrumentação e o arranjo experimental poderiam ser optimizados empregando-se fontes de irradiação mais potentes e mais estáveis, melhorando assim a relação sinal/ruído. O sistema de aquisição de espectros poderia empregar uma sonda de fibra óptica de maior diâmetro,

possibilitando a análise da variação espectral de uma área mais representativa do dosímetro em função do tempo de irradiação. Outro fator importante que pode ser optimizado é o procedimento de aplicação dos produtos sobre o substrato de modo a se obter amostras mais homogêneas, diminuindo o erro decorrente do grau de heterogeneidade na espessura dos filmes de protetores solares aplicados sobre a pele artificial. Além disso, podem ser futuramente desenvolvidas interfaces de TiO_2 com novos corantes, sintéticos ou naturais, em substituição ao complexo de inclusão carboxi-metil-β-ciclodextrina/$[Fe(Br\text{-}ph\text{-}terpy)_2]^{2+}$ objetivando a simplificação dos dosímetros, ganho de sensibilidade e de eficiência quântica do sistema, principalmente na avaliação de formulações com FPS superiores a 30.

Em função do exposto acima, os métodos desenvolvidos são úteis para a realização de análises de formulações cosméticas e tomadas de decisão em etapas de desenvolvimento de produtos, podendo eventualmente vir a substituir parcial ou totalmente os métodos *in vivo* pois, como foi demonstrado, proporcionam resultados confiáveis, rápidos e com custo reduzido, além da reduzirem o número de voluntários expostos à radiação ultravioleta durante os ensaios clínicos, sendo métodos alternativos atraentes em relação aos métodos atualmente disponíveis.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apresentamos nesse trabalho o estudo de um sistema fotoquímico nanoestruturado e a sua aplicação no desenvolvimento de metodologias para a determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas. Diversos parâmetros experimentais foram avaliados de forma a propormos duas metodologias *in vitro* que podem ser utilizadas para a determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas. Os resultados apresentaram boa correlação com os FPSs obtidos pelo método convencional *in vivo*, o que os torna bastante interessantes já que proporcionam uma alternativa éticamente correta, de baixo custo e rápida para a avaliação de protetores solares. Os métodos possibilitam a redução da exposição de voluntários humanos à procedimentos invasivos como os que são atualmente empregados.

Paralelamente ao que foi exposto nessa dissertação e em função do ineditismo da abordagem, foram realizados estudos de otimização que resultaram no refinamento da técnica e nos motivaram a proteger a invenção junto ao INPI e eventualmente a nível internacional. Além disso, estão sendo prospectados parceiros na iniciativa privada para que possamos viabilizar o desenvolvimento de um equipamento dedicado à determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas, tendo-se em vista que o conceito foi comprovado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Keesling, B.; Friedman, H.S. Psychosocial factors in sunbathing and sunscreen use. *Health Psychology*, **1987**, 477-493

[2] Pathak, M.A.; *J Dermatol*., **1996,** 11, 783-800

[3] Honda, K.; Inoue, S.; *Int. J. Biometeorol*., **1988**, 32(2), 92-94

[4] Inoue, S.; Kabaya, M.; *Int. J. Biometeorol*., **1989**, 33, 145-150

[5] Udagawa, Y.; Nagasawa, H.; *In Vivo*, **2000**, 14, 321-326

[6] Aberdeen Proving Ground MD, U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine, **2001**, 2

[7] Pibernat, R.; García, P.; *Med Integral*, **1997**; 30(2), 64-71

[8] Gilchrest, B.A.; Tang, A.; *Journal of Dermatol Sci*., **1996**; 11(1), 41-50

[9] Okuno, E.; Vilela, M.A.C.; Radiação Ultravioleta: Características e Efeitos. São Paulo – Livraria da Física/Sociedade Brasileira de Física, **2005**, 78

[10] Amron, D.M., Moy, R.L.; *J Dermatol Surg Oncol*., **1991**; 17,370-372

[11] Diffey, B.L., Larko, O.; *Photo-Dermatology*, **1984**; 1,30–37

[12] Rigel, D.S.; Rigel, E.G.; Rigel, A.C.; *J Am Acad Dermatol*., **1999**; 40, 114–116

[13] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who271/en/, acesso em 31/07/2010

[14] Global Solar UV Index – A practical guide - World Health Organization, **2002**

[15] Report of the WMO meeting of experts on UVB measurements, data quality and standardization of UV indices, Les Diablerets, Switzerland, **1994**

[16] Global Atmosphere Watch, No. 95; Geneva, World Meteorological Organization, **1995**

[17] Educating the public about the hazards of ultraviolet radiation. Summary report. International workshop, Baltimore, **1996**

[18] Report of the WMO–WHO meeting of experts on standardization of UV indices and their dissemination to the public, Les Diablerets, Switzerland, **1997**

[19] UV index in practical use. Proceedings of an international workshop. Munich, Federal Office for Radiation Protection, Institute of Radiation Hygiene, **2002**

[20] Global Solar UV Index – A practical guide - World Health Organization **2002**

[21] INPE – Instituto nacional de Pesquisas Espaciais, http://www.inpe.br/, acesso em 30/07/2010

[22] Kirchhoff, V.W.J.H., Ozônio e Radiação UV-B. *Transtec Editorial*, **1995**

[23] James, W.; Berger, T.; Elston, D.; Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology; *Saunders*; **2005**, 10ªed., 11-12

[24] Marks, J.G; Miller, J.; Principles of Dermatology; *Elsevier Inc.*; **2006**, 4ªed., 8-9

[25] http://www.siteman.wustl.edu, acesso em 29/07/2010

[26] Fitzpatrick, T.B.; Bolognia, J.L.; Melanin: its role in human photoprotection. Overland Park, KS: *Valdenmar Publishing Co*, **1995**

[27] Fitzpatrick, T.B.;. *Arch Dermatol.;* **1988**;124, 869-871

[28] IARC, International Agency for Research on Cancer; Solar and ultraviolet radiation. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. **1992**, 55

[29] Chang, N.B.; Feng, R.; Gao, Z.; Gao, W.; *International Journal of Hygiene and Environmental Health.;* **2010**, 213, 359–368

[30] FDA, Department of Health and Human Services, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Final Monograph. 21 CFR, **1999**

[31] Gilchrest, B.A.; Soter, N.A.; Stoff, J.S.; Mihm, M.C.; *J Am Acad Dermatol.;* **1981**, 5, 411-422

[32] Honigsmann, H.; Schuler, G.; Aberer, W.; Romani, N.; Wo, W.K.; *J Invest Dermatol*.; **1986**, 87, 648-52

[33] Comité Conjoint sur l'Exposition aux UV, Le bronzage artificiel au Québec: Bilan des connaissances et recommandations, Rapport du comité conjoint sur l'exposifion am rayons ultraviolets et le bronzage artifice, Gouvernement du Québec: Ministère de la santé et des SeMces Sociaux, Québec, **1998**

[34] Sheehan, J.M., Potten, C.S.; Young, A.R.; *Photochem Photobiol*.; **1998**, 68, 588-592

[35] Ziegler, A.; Jonason, A.S.; Leffeii, D.J.; Simon, J.A.; Sharma, H.W.; Kirrimehan, J.; Remington, L.; Jacks, T.; Brash, D.E.; *Nature*; **1994**, 372, 773-776

[36] Kligman, L.H.; *Clin. Dermatol*.; **1996**, 14, 183 -195

[37] Meunier, L.; Raison-Peyron, N.; Meynadier, J.; *Rev Med Interne*.; **1998**, 19, 247-54

[38] Marieb, E.N.; Laurendeau, G.; In: Anatomie et Physiologie Humaines; Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Québec; **1993**, 152-154

[39] http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335, acesso em 30/07/2010

[40] http://www.bbc.co.uk/health/physical_health/conditions/in_depth/cancer/skincancer1.shtml, acesso em 30/07/2010

[41] Steiner, D.; *Revista Racine*, **1998**, 41, 4-9

[42] Lowe, N.J.; Shaath, N.A.; Pathak, M.A. Sunscreen, development, evaluation and regulatory aspects. 2 ed. New York: Marcel Dekker, *Cosmetic Science and Technology Series; **1997**,* 15, 263-283

[43] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Regulamento técnico "Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes", Resolução RDC 47, **2006**

[44] Costabile, J.A.; *Cosmetics & Toiletries*; **1989**, 1, 49-52

[45] Kollias, N.; Baqer, A.;Razi-Naqvi, K.; *Spectroscopy Letters;* **1986**, 19, 149-150

[46] Sayre, R.M., Kollias, N.; *J. Soc. Cosmet. Chem*.; **1990**, 4, 103-109

[47] Pascual, J.; Camassel, J.; Mathieu, H.; *Phys. Rev. Lett*.; **1977**, 39, 1490

[48] Schueller, R.; Romanowski, P. *Cosmetics & Toiletries*, **1999**, 114, 49-57

[49] Gasparro, F.P.; Mitchnick, M.; Nash, J.F.; *Photochemistry and Photobiology;* **1998**, 68, 243-256

[50] Kollias, N.; *Arch Dermatol*.; **1999**, 135, 209-210

[51] Mota, E.D.; Páez, M.T.C.; Serrano, S.C.; *Medifam*.; **2003**, 13, 159-165

[52] Flor, J; Dolavos, M.R.; Corrêa, M.A.; *Química Nova*, **2007**, 30, 153-158

[53] Kimbrough, D.R.; *J. Chem. Educ.*; **1997**, 74 (1), 51

[54] Bernerd, F., Vioux, C., Asselineau, D.; *Photochemistry and Photobiology*; **2000**, 71(3), 314–320

[55] Kligman, L.; Akin, L.F.; Kligman, A.; *J. Am. Acad. Dermatol.*; **1980**, 3, 30–35.

[56] Fourtanier, A.; *Photochem. Photobiol*.; **1996**, 64, 688–693

[57] Kligman, L., Akin, F.J.; Kligman, A.M. ; *J. Invest. Dermatol*.; **1982**, 78, 181–189.

[58] Fourtanier, A.; Labat-Robert, J.; Kern, P.; Berrebi, C.; Gracia, A.M.; Boyer, B.; *Photochem. Photobiol*.; **1992**, 55, 549–560.

[59] Thompson, S.C.; Jolley, D.; Mark, R.; *N. Engl. J. Med*.; **1993**, 329, 1147–1151

[60] Yarosh, D.B.; Klein, J.; *Cancer J*.; **1997**, 10, 49–52

[61] Ananthaswamy, H.N.; Loughlin, S.M.; Cox, P.; Evans, R.L.; Ullrich, S.E.; Kripke, M.; *Nature Med*.; **1997**, 3, 510–514.

[62] Dept of Health, Education and Welfare - Food and Drug Administration. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. *Federal Register*, **1978**, 43, 38206-38269,

[63] Ellinger, F.; *Arch exp Path u Pharmakologie*; **1934**, 175, 481-488

[64] Henne, W.; *Parf u Kosmet.*; **1983**, 64, 415-423

[65] Schulze, R.; *Parf u Kosmet.;**1956**,* 37, 310-315

[66] Greiter, F.; *Parf u Kosmet.;* **1974**, 55, 70-75

[67] DIN 67501; *Deutsches Institut für Normung*, **1984**

[68] Australian/New Zealand Standard. AS/NZS **1986**

[69] JCIA, Japanese Cosmetic Industry Association, *Standard SPF Test Method*, **1991** e **1999**

[70] South African Bureau of Standards: Standard specifications, sunscreen products. SABS 1557:**1992** e 1557:**2002**

[71] Australian/New Zealand Standard. AS/NZS 2604:**1998**

[72] FDA, Department of Health and Human Services, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Tentative Final Monograph. 21 CFR, **1993**

[73] FDA, Department of Health and Human Services, USA. Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Final Monograph. 21 CFR, **1999**

[74] FDA, Department of Health and Human Services, USA. Proposed Amendment of the Final Sunscreen Monograph. Vol. 72, nº 165, 49070-49122, **2007**

[75] Colipa: Sun protection factor test method. COLIPA Publication Ref 94/289, **1994**

[76] CTFA SA, COLIPA, JCIA; International Sun Protection Factor Test Method, **2003**

[77] CTFA SA, COLIPA, JCIA, CTFA-USA; International Sun Protection Factor Test Method, **2006**

[78] Brown, M.; SPF testing in Europe: The International SPF Test Method. In: Shaath NA. Sunscreens: Regulation and Commercial Development, 3rd ed. Boca Raton: *T&F Informa*; **2005**, 779-806.

[79] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Regulamento Técnico Sobre Protetores Solares em Cosméticos, Resolução RDC 237, publicada no Diário Oficial em 28/08/**2002**

[80] ISO 24444:**2010** (em desenvolvimento) - http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=46523, acesso em 10/08/2010

[81] Chardon, A.; Crétois, I.; Hourseau, C.; *16th IFSCC Congress*, New York, **1990**, 1, 51-70

[82] Schalka, S; Reis, V.M.S.; Cucé, L.C.; *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*; **2009**, 25, 175–180

[83] Mérot, F.; Masson, P.; Poster; *IFSCC between conference*, Helsinki. **1991**

[84] Fourneron, J. D.; Faraud, F.; Fauneron, A.; *C. R. Acad. Sci.;* **1999**, 2, 421-427

[85] Gordon, V.C.; *Parfum. Cosmet. Arom*.; **1993**, 112, 62-65

[86] Mansur, J. S.; Breder, M. N. R.; Mansur, M. C. A.; Azulay, R. D. *An. Bras. Dermatol.*; **1986**, 61, 121-124

[87] Pissavini, M.; Ferrero, L.; Alaro, V.; Heinrich, U.; Tronnier, H.; Kockott, D.; Lutz, D.; Tournier, V.; Zambonin, M.; Meloni, M.; *Cosmet. Toiletries;* **2003**, 118, 63-72

[88] Walters, C.; Keeney, A.; Wigal, C. T.; Johnstom, C. R.; Cornelius, R. D.; *J. Chem. Educ*.; **1997**, 74, 99-102

[89] Pissavini, M.; Ferrero, L.; *Business Briefing: Global Cosmetics Manufacturing*; **2004**, 01-05

[90] Diffey, B.L.; Robson, J.; *Int J Cosmet Sci*.; **1989**; 40, 127–133

[91] Kelley, K.A.; Laskar, P.A.; Ewing, G.D.; Dromgoole, S.H.; Lichtin, J.L.; Sakr, A.A.; *J Soc Cosmet Chem*.; **1993**; 44: 139–151

[92] Spruce, S.R.; Hewitt, J.P.; *Euro Cosmet*.; **1995**; 6, 14–20

[93] Pearse, A.D.; Edwards, C.; *Int J Cosmet Sci*.; **1993**;15:234–244

[94] Marginean, G.; Fructus, A.E.; *Int J Cosmet Sci*.; **1994**; 17, 233–243

[95] Stokes, R.P.; Diffey, B.L.; *Int. J. Cosmet. Sci*.; **1997**; 48: 289–295

[96] Gers-Barlag, H.; Bimczok, R.; Driller, H.; Finkel, P.; Gonzenbach, H.; Heinrich, U.; Johncock, W.; Klette, E.; Kockott, D.; Langner, R.; Pflücker, F.; Rudolph, T.; Schneider, P.; Tronnier, H.; Westenfelder, H.; Wünsch, T.;. *SÖFW J.*; **2001**; 127: 17–20

[97] Oliveira, S.L., Mansanares, A. M., Silva, E. C. and Barja, P. R.; *The European Physical Journal*; **2008**, 153, 475-478

[98] Pissavini, M.F., Alard, L., Heinrich, V., Tronnier, U., Kockott, H., Lutz, D., Tournier, D., Zambonin, V., Meloni, M.; *Cosmet Toiletries*; **2003**; 118: 63–72

[99] Garoli, D.; Pelizzo, M.G.; Nicolosi, P.; Peserico, A.; Tonin, E.; Alaibac, M.; *Journal of Dermatological Science*; **2009**, 56, 89–98

[100] Toma, S.H.; Bonacin, J.A.; Araki, K.; Toma, H.E.; *Surface Science*; **2006**, 600, 4591–4597

[101] Lehn, J. M.; *Science;* **1985**, 227, 849-856

[102] Lehn, J. M.; Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives; VCH: Weinheim, **1995**

[103] Hofmann, K. A.; Kuspert, Z. Z.; *Anorg. Allg. Chem*.; **1897**, 69, 204

[104] Powell, H. M. *J. Chem. Soc*. **1948**, 61-73

[105] Powell, H. M.; Rayner, J. H. *Nature;* **1949**, 163, 566-567

[106] Williams, F. V. *J. Am. Chem. Soc*. **1957**, 79, 5876-5877

[107] Cram, D. J.; Steinberg, H. *J. Am. Chem. Soc*. **1951**, 73, 5691-5704

[108] Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc*.; **1967**, 89, 7017-7036.

[109] Dietrich, B.; Lehn, J. M.; Sauvage, J. P.; *Tetrahedron Lett*. **1969**, 10, 2889-2892

[110] Bonacin, J. A.; Tese de Doutorado, *Instituto de Química*, Universidade de São Paulo, **2007**

[111] Stewart, J.J.P.; *J. Comp. Chem*. **1989**, 10, 209

[112] Constable, E.C.; Handel, R.; Housecroft, C.E.; Neuburger, M.; Schofield, E.R.; Zehnder, M.; *Polyhedron*, **2004**, 23, 143

[113] S.H. Toma, Tese de doutorado, Instituto de Química*, Universidade de São Paulo*, **2007**

[114] Strohalm, M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., Havlicek, V.; *Anal Chem*.; **2010**, 82 (11), 4648-4651

[115] Dauphas, N.; Rouxel, O.; *Mass Spectrometry Reviews*, **2006**, 25, 515-550

[116] U.S. Schubert, H.Hofmeier, G.R. Newkome, *Modern Terpyridine Chemistry*, Willey, **2006**

[117] E.C. Constable, G.Baum, E. Bill, R. Dyson, R. Eldik, D. Fenske, S. Kaderli, D. Morris, A. Neubrand, M. Neuburger, D.R. Smith, K. Wieghardt, M. Zehnder, A.D. Zuberbühler, *Chem. Eur. J*. **1999**, 5(2), 497

[118] Szejtli, J.; *Chem. Rev*.; **1998**, 98, 1743

[119] Connors, K. A.; *Chem. Rev*.; **1997**, 97, 1325.

[120] Szejtli, J., Cyclodextrin Technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1988**, 34–39

[121] Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T.; *Chem. Rev*.; **1998**, 98, 2045

[122] Toma, S.H.; Bonacin, J.A.; Araki, K.; Toma, H.E.; *Surface Science*; **2006**, 600, 4591–4597

[123] Turkovic, A.; Ivanda, M.; Drasner, A.; Vranesa, V.; Persin, M.; *Thin Solid Films;* **1991**, 189, 199

[124] Orsolya Egyed; *Vibrational Spectroscopy*, **1990**, 1, 225-227

[125] Assumpção, A.M.C.; Tese de Doutorado, *Instituto de Química*, Universidade de São Paulo, **2008**

[126] Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A.M.; *Chem Rev*. **1993**, 93,671-698

[127] Childs, L.P.; Ollis, D.F.; *J. Catal*.; **1980**, 66, 383-390

[128] Murphy, W.R.; Veerkamp, T.F.; Leland, T.W.; *J.Catal.*; **1976**, 43, 304-321

[129]COLIPA - Guidelines for Monitoring UV Radiation Sources **2007**; http://colipa.eu/publications-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association/guidelines.html?view=item&id=69, acesso em 23/07/2010

SÚMULA CURRICULAR

Leonardo Rodrigues de Paula
Nascido em 14 de Setembro de 1978, Frutal(MG)

EDUCAÇÃO

- Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
  - *Bacharelado em Química – 1998-2001*
- Universidade Estadual Paulista – UNESP
  - *Extensão em cosmetologia – 2007*
- Vrije Universiteit Brussel - Bélgica
  - *Specialization in Dermato-Cosmetic Sciences – 2009*
- Fundação Getúlio Vargas – Business Institute
  - *MBA em Gerenciamento de Projetos – 2008-2010*

OCUPAÇÃO

Johnson & Johnson do Brasil

Cientista Especialista – Pesquisa e Desenvolvimento

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Fiorucci, Antonio R. ; **de Paula, Leonardo R**. ; Neves, Eduardo A. ; Cavalheiro, Éder T. G.; *Journal of Chemical and Engineering Data*; **2002**, 47, 1510-1513

FIORUCCI, Antonio Rogerio ; **PAULA, L. R**. ; CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes ; NEVES, Eduardo Fausto de Almeida; *Anais da Associação Brasileira de Química*; **2002**, 51, 74-79

PAULA, L. R. ; FIORUCCI, A.R.; CAVALHEIRO, E.T.G.; NEVES, E.F.A.; Solubilidade e caráter de ligação de compostos alcalinos e alcalino-terrosos de EDTA dineutralizado.. In: 24a. REUNIÃO ANUAL DA SBQ, **2001**, 1,. p. QA173.

PAULA, L. R. ; FIORUCCI, A.R.; CAVALHEIRO, E.T.G.; Tratamento eletroquímico do eletrodo de pasta de carbono para a determinação voltamétrica de triptofano. In: 11o Encontro Nacional de Química Analítica, **2001**, 1, p. EQ12.

SOARES, M.H.F.B.; FIORUCCI, A.R.; **PAULA, L. R.** ; CAVALHEIRO, E.T.G.; Uma descrição dos sítios na internet (sites) brasileiros dedicados à educação em química.. In: II Encontro latino americano de ensino de química, **2000**, p. 91.

PAULA, L. R. ; CAVALHEIRO, E.T.G.; NEVES, E.F.A.; FIORUCCI, A.R.; Correlação entre solubilidade, raio iônico, e caráter de ligação metal-carboxila em sais de EDTA mono e di-neutralizado. Anais do SIC UFOP, **2000**, 1, 117.

S.L.Oliveira, **L.R. Paula**; N. Cobeiros; M.B. Guzman; “Avaliação da fotoestabilidade de protetores solares”; 59º Congresso Brasileiro de Dermatologia; Natal-RN; **2004**.

PATENTES

Paula, L.R.; Parussulo, A.L.A.; Araki, K.; Toma, H.E.; “APARATOS E METODOS PARA AVALIAÇÃO, IN VITRO, DE FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR”; Processo: 10.1.1845.46.4; 05/11/**2010**.