UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores
com ação em toda a região do espectro solar**

Carla Souza

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores
com ação em toda a região do espectro solar**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Carla Souza

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria
Berardo Gonçalves Maia Campos

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 16/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Carla

Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores com ação em toda a região do espectro solar. Ribeirão Preto, 2016.

147 f.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Maia Campos, Patrícia Maria Berardo Gonçalves

1. Protetor solar 2. Radiação solar 3. Eficácia clínica 4. Fotoenvelhecimento cutâneo 5. Antioxidantes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla Souza

Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores com ação em toda a região do espectro solar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Carlos e Noeme. Não há como expressar toda minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a vocês, como forma de agradecimento a todo o amor e apoio e por nunca terem medido esforços em me garantir a melhor educação.

À toda minha família, que mesmo de longe torcem pelo meu sucesso. Em especial, às minhas irmãs, Emiliana e Mariana, e ao meu irmão Léo, pelo carinho, torcida e apoio em todos os momentos.

À Cris e Zé, Lolô, Gui, Fran, Fer e à todos dessa segunda família que Deus me deu; muito obrigada por toda a torcida e carinho. E em especial, ao meu namorado e melhor amigo, Henrique, pelo companheirismo, apoio, incentivo e amor incondicionais.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Patrícia Maia Campos, por todas as oportunidades de aprendizado, orientação e crescimento pessoal e profissional.

À todos os professores da Escola Estadual Arthur Tibães, Colégio Diamantinense Pitágoras, UFVJM e FCFRP-USP, que contribuíram para minha formação acadêmica e, em especial à minha mãe, exemplo de profissionalismo, amor e dedicação ao ensino.

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe, com quem tive meu primeiro contato com a pesquisa, ainda durante a graduação e à Prof.^a Dr.^a Marilisa Guimarães Lara pela orientação e todo o conhecimento construído durante a realização do meu mestrado, fundamentais para que eu conquistasse mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Jurgen Lademann, pela oportunidade de realizar meu doutorado sanduíche no Centro de Fisiologia Cutânea Aplicada e Experimental da Universidade de Medicina de Berlim - Charité, e à todos os colegas do Grupo de Pesquisa, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender ainda mais.

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas e Prof.^a Dr.^a Renata Fonseca Vianna Lopez, pela disponibilidade de utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho. E à Prof.^a Lorena Gaspar pelo apoio e contato com o Prof. Lademann.

Às técnicas de laboratório, Patrícia e Áurea, pela ajuda na execução de alguns dos experimentos realizados.

Às pós-graduandas do NEATEC, Livia, Fran, Júlia, Marina e Wan; às alunas de IC e à Taís, pela amizade, apoio, torcida e colaboração de sempre.

Às amigas Ju Vescovi, Ju Maria, Lidi e Lari por todas as risadas, companhia e torcida em todos os momentos que convivemos em Ribeirão Preto.

À todas as voluntárias deste estudo, pela valiosíssima colaboração e disponibilidade, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Às empresas do ramo cosmético que forneceram as matérias-primas utilizadas neste estudo, e às empresas Chemyunion e Allergisa, pela realização de alguns dos testes deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, à todos os funcionários da FCFRP-USP e à CAPES, pelo suporte financeiro concedido, inclusive para realização do meu doutorado sanduíche.

À todos que torceram e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada !

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertence”

- Albert Einstein

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brasil), com período sanduíche no Centro de Fisiologia Cutânea Aplicada e Experimental (CCP) da Universidade de Medicina de Berlim - Charité (Berlim, Alemanha).

RESUMO

SOUZA, C. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores com ação em toda a região do espectro solar**. 2016. 144f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O uso frequente de protetores solares é uma das medidas de fotoproteção mais eficazes para prevenção dos danos causados pela radiação solar. Por muitos anos, medidas de fotoproteção estavam relacionadas apenas aos danos causados apenas pela radiação UVB/UVA. No entanto, as radiações visível (VIS) e infravermelho (IV) também têm demonstrado ser prejudicial à saúde humana. Logo, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a eficácia clínica de um protetor solar contendo filtros UV e os antioxidantes, *Spirulina* e dimetilmetoxi cromanol veiculado em Nanopartículas Lipídicas Sólidas (DMC-NLS), em toda a região do espectro solar. NLS, contendo ou não DMC, foram desenvolvidas à base de cera de abelha e/ou cera de carnaúba usando a técnica de microemulsão à quente e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula (z), índice de polidispersividade (IPd), potencial zeta (PZ), pH e eficiência de encapsulação (EE%). Foram desenvolvidas formulações do tipo gel-creme (FVE-veículo), acrescidas de DMC-NLS (FVN), filtros UV (FFE) e filtros UV associados à *Spirulina* e DMC-NLS (FFAN), e avaliadas quanto à estabilidade física, comportamento reológico, penetração cutânea, potencial antioxidante, bem como a proteção contra a formação radicalar em pele de orelha de porco após exposição à radiação UVB/UVA, VIS e IV. Além do FPS *in vivo*, a proteção UVA *in vitro* (comprimento de onda crítico- λ_c e razão UVA/UVB) e FPS *in vitro* também foram avaliados. Por fim, foram realizados estudos de eficácia clínica para as formulações FFE e FFAN após aplicação na face de 44 voluntárias sadias por 84 dias, usando técnicas de biofísica e análise de imagem da pele para determinação do conteúdo aquoso de estrato córneo (CAEC), da perda transepidérmica de água (TEWL), da ecogenicidade e das propriedades mecânicas da pele, além da análise sensorial dessas formulações. DMC-NLS desenvolvida a partir de cera de abelha se apresentaram esféricas e com z ($120,5 \pm 20,4$ nm), IPd ($0,449 \pm 0,012$), PZ ($-10,4 \pm 0,5$ mV) pH ($3,95 \pm 0,02$) e EE% ($96,02 \pm 0,81\%$) adequados aos objetivos do estudo e permaneceram estáveis por 54 dias à 4°C. Todas as formulações permaneceram fisicamente estáveis após 60 dias, apresentaram comportamento não-newtoniano e pseudoplástico, com tixotropia, e potencial antioxidante igual a $32,0 \pm 1,0 \times 10^4$ radicais/mg e $77,0 \pm 4,0 \times 10^4$ radicais/mg, respectivamente, para FFE e FFAN. A formulação FFAN penetrou até a profundidade de $10,4 \pm 1,7$ μ m e $11,2 \pm 3,0$ μ m, após 1 e 6 horas de penetração, respectivamente, e nenhum filtro solar atingiu a solução receptora. A formação radicalar foi reduzida pelas formulações FFE e FFAN nas regiões UV e VIS; e uma proteção superior foi observada para a formulação FFAN, contendo antioxidantes, nas regiões UV, VIS e IV. O FPS para FFE e FFAN foi igual a 30, com boa proteção UVA e λ_c de 378 nm. Ambas as formulações melhoraram o CAEC, o TEWL, as propriedades mecânicas e a ecogenicidade da pele; no entanto, a formulação FFAN demonstrou melhores resultados comparado com FFE. Na análise sensorial, a maioria das voluntárias demonstraram intenção de compra do produto e relataram aumento da hidratação e elasticidade da pele, e pele mais macia. Portanto, podemos concluir que o uso frequente do protetor solar preveniu os danos causados em toda a região do espectro solar, e a incorporação da *Spirulina* e DMC-NLS, foi capaz de potencializar seu efeito protetor contra a radiação UV, VIS e IV.

Palavras-chave: protetor solar, radiação solar, eficácia clínica, fotoenvelhecimento cutâneo, antioxidantes.

ABSTRACT

SOUZA, C. **Development and clinical efficacy evaluation of sunscreens for protection in the whole solar spectral range**. 2016. 144p. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The frequent use of sunscreen is one of the most effective photoprotection strategies to prevent the damages caused by solar radiation. For years photoprotection was associated only to the damages caused by UVB and UVA radiation. However, the visible (VIS) and near-infrared (NIR) radiation have also been shown to be harmful to human health. Therefore, the aim of this study was to develop and evaluate the clinical efficacy of a sunscreen containing UV filters and the antioxidants, *Spirulina* and dimethylmethoxy chromanol-loaded Solid Lipid Nanoparticles (DMC-SLN), in the whole solar spectrum range. SLN, containing or not DMC, were developed using beeswax and/or carnauba wax as solid lipids, using the hot melt microemulsion technique and characterized regarding to particle size (z), polydispersity index (Pdl), zeta potential (ZP), pH and encapsulation efficiency (EE%). Gel-cream formulations (FVE-vehicle) containing DMC-SLN (FVN), UV filters (FFE) and UV filters in association to *Spirulina* and DMC-SLN (FFAN) were developed and evaluated through the physical stability, rheological behavior, skin penetration studies on pig ear skin, antioxidant potential as well as protection against the radical formation on pig ear skin after exposure to UVB/UVA, VIS and NIR radiation. In addition to the *in vivo* SPF, *in vitro* UVA protection (λ_c -critical wavelength and UVA/UVB ratio) and *in vitro* SPF were also evaluated. Finally, clinical efficacy studies were performed to the FFE and FFAN formulations after their application on the face skin of 44 volunteers for 84 days using biophysical and skin imaging techniques in order to determine the stratum corneum water content (SCWC), transepidermal water loss (TEWL), skin echogenicity and mechanical properties, in addition to the sensory analysis of these formulations. DMC-SLN beeswax were spherical in shape and showed appropriated z (120.5 ± 20.4 nm), IPd (0.449 ± 0.012), PZ (-10.4 ± 0.5 mV), pH (3.95 ± 0.02) and EE% ($96.02 \pm 0.81\%$) according to the objective of this study; and it remained stable after 54 days of storage at 4°C. All the studied formulations remained physically stable after 60 days and showed non-Newtonian and pseudoplastic behavior with thixotropic, antioxidant potencial equal to $32.0 \pm 1.0 \times 10^4$ radicals/mg and $77.0 \pm 4.0 \times 10^4$ radicals/mg, respectively, for FFE and FFAN. The formulation FFAN penetrated into the skin until the depth of 10.4 ± 1.7 μ m and 11.2 ± 3.0 μ m 1 and 6 hours after penetration, respectively, and none of the UV filters reached the receptor solution. The radical formation was reduced by FFE and FFAN formulations in the UV and VIS range; and an enhanced protection was observed for FFAN formulation, containing antioxidant, in the UV, VIS and NIR ranges. The SPF value for FFE and FFAN was 30, with good UVA protection and λ_c equal to 378 nm. Both formulations improved the SCWC and TEWL values and the skin mechanical properties and echogenicity; however, FFAN formulation showed better results compared to FFE. In the sensory analysis most of the volunteers demonstrated product-buying intention and reported a more hydrated, firmer and smoother skin. Therefore we can conclude that the frequent use of sunscreen prevented the skin damage caused in the whole solar spectrum range, and the incorporation of *Spirulina* and DMC-SLN, enhanced the sunscreen protective effect against UV, VIS and NIR radiation.

Keywords: sunscreen, solar radiation, clinical efficacy, skin photoaging, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Variação da incidência das radiações UVA e UVB ao longo do dia. Área X: horário de menor incidência da radiação UV; Área Y: horário de maior incidência da radiação UV.	6
Figura 2: Ilustração do Microscópio Confocal Raman: 1) Fonte do laser (785 nm); 2) Filtro de curta passagem; 3) Objetiva; 4) Espelhos; 5) Amostrador; 6) Filtro de rejeição do laser; 7) Sistema de foco; 8) Fibra óptica; 9) Espectro; 10) Câmara acoplada; 11) Computador.	50
Figura 3: Curva de deformação da pele obtida pelo equipamento Cutometer®.....	62
Figura 4: Distribuição do tamanho de partícula para A) F1 e B) F2 determinados por espalhamento dinâmico de luz após 24 horas de preparo.....	68
Figura 5: Microscopia de força atômica: A) visão topográfica - F2 e visão frontal para B) F1 e C) F2, após 24 horas de preparo.	69
Figura 6: Valores de pH (média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN durante 60 dias de armazenamento em diferentes condições ambientais (n=3)..	73
Figura 7: Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN, avaliadas 24 horas após preparo e armazenadas à temperatura ambiente (n=3).	75
Figura 8: Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN, avaliadas 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).....	78
Figura 9: Valores do índice de fluxo (n; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).	79
Figura 10: Valores do índice de consistência (K; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).	79
Figura 11: Valores da tensão limite de escoamento (σ_0 ; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).....	80
Figura 12: Valores da área de histerese (média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).	80
Figura 13: Perfil cromatográfico da solução de trabalho contendo o antioxidante DMC (1) e os filtros solares DHHB (2), EHT (3), MBBT (4), BEMT (5), nas concentrações de 50,0 $\mu\text{g/mL}$, à 312 nm (linha cinza) e 220 nm (linha preta).	82

Figura 14: Avaliação da seletividade do método em A) tampão fosfato pH 7,4 + 4% albumina bovina; B) formulação FFAN e C) pele de orelha de porco; 1) EHT, 2) DHHB, 3) MBBT, 4) BEMT.	83
Figura 15: Curvas padrão média obtidas para A) BEMT, B) MBBT, C) DHHB, D) EHT e E) DMC, usando a metodologia analítica desenvolvida por CLAE.	85
Figura 16: Espectros Raman obtidos por MCR para pele de orelha de porco tratada (linha azul) e não tratada (linha verde) com a formulação FFAN após 1 hora de penetração, nas profundidades de A) 2 μ m, B) 6 μ m e C) 8 μ m.	88
Figura 17: Perfil de penetração cutânea da formulação FFAN em pele de orelha de porco, após 1 e 6 horas de penetração, avaliada por Microscopia Confocal Raman (n=5).	90
Figura 18: Formação radicalar cumulativa (média $\pm$ DP) em função do tempo, em pele de orelha de porco, para as formulações FFE e FFAN, após exposição à A) radiação UVA/UVB; B) radiação VIS e C) radiação IV (n=10).	93
Figura 19: Formação radicalar cumulativa (média $\pm$ DP) após 6 minutos de exposição à radiação UVA/UVB, VIS e IV, em pele de orelha de porco para as formulações FFE e FFAN (n=10).	94
Figura 20: Espectro de absorção da formulação FFAN na região do UV.	97
Figura 21: Conteúdo aquoso do estrato córneo das regiões A) Frontal e B) Periorbital, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE.	103
Figura 22: Perda transepidérmica de água das regiões A) Frontal e B) Periorbital, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE.	103
Figura 23: Valores obtidos para A) Espessura da derme, B) PBE, C) PAE e D) Relação de ecogenicidade, determinados na região frontal das voluntárias, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=22).	105
Figura 24: Valores obtidos para A) Espessura da derme, B) PBE, C) PAE e D) Relação de ecogenicidade, determinados na região periorbital das voluntárias, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=22).	106
Figura 25: Imagem bidimensional da região frontal de uma mesma voluntária A) e B) com 50 anos e C e D) com 34 anos, após 0 (T0) e 84 (T84) dias de aplicação da formulação FFAN, obtidas com auxílio do Ultrassom 20-MHz.	107
Figura 26: Valores obtidos para A) R2, B) R5, C) R6 e D) R7, determinados na região frontal das voluntárias após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=21).	110
Figura 27: Valores obtidos para A) R2, B) R5, C) R6 e D) R7, determinados na região periorbital das voluntárias após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=44).	111

Figura 28: Avaliação do sensorial das formulações objeto de estudo de acordo com questionário “ <i>check-all-that-apply</i> ” (CATA), (n=44).	113
--	------------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos fototipos de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988).	11
Tabela 2: Classificação de acordo com o <i>Boot's Star Rating System</i> da proteção UVA (BOOTS THE CHEMISTS, 2004).	16
Tabela 3: Relação entre absorbância e transmitância <i>versus</i> FPS. Adaptado de SCBALK & REIS (2011).	18
Tabela 4: Composição (%) das formulações desenvolvidas.	36
Tabela 5: Parâmetros físico-químicos dos filtros diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBBT) and ethylhexyl triazone (EHT).	37
Tabela 6: Composição (%) das NLS desenvolvidas.	38
Tabela 7: Gradiente utilizado para separação cromatográfica por CLAE.	43
Tabela 8: Tamanho de partícula e IPd (média $\pm$ DP) para as NLS desenvolvidas à partir das ceras de abelha e de carnaúba, após 24 horas de preparo (n=3).	67
Tabela 9: Valores médios dos parâmetros avaliados durante teste preliminar de estabilidade para F1 após 54 dias de preparo e em diferentes condições de armazenamento (n=3).	71
Tabela 10: Valores médios dos parâmetros avaliados durante teste preliminar de estabilidade para F2 após 54 dias de preparo e em diferentes condições de armazenamento (n=3).	71
Tabela 11: Valores (média $\pm$ DP) para o índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e tensão limite de escoamento (σ_0), para as formulações FVE, FVN, FFE e FFAN, após 24 horas de preparo (n=3).	76
Tabela 12: Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) obtidos segundo metodologia analítica desenvolvida para quantificação dos filtros solares e antioxidante estudados.	84
Tabela 13: Resultados obtidos para o parâmetro precisão para os analitos estudados.	86
Tabela 14: Resultados obtidos para o parâmetro exatidão para os analitos estudados.	86
Tabela 15: Porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) para os filtros solares à partir do estrato córneo da pele de orelha de porco (n=3).	86
Tabela 16: Porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) para os filtros solares à partir da D+E da pele de orelha de porco (n=3).	87
Tabela 17: Porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) para os filtros solares à partir da formulação FFAN, (n=3).	87

Tabela 18: Quantidade de filtro solar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; média $\pm$ DP) encontrada na solução receptora, SC e D+E após estudos de penetração e retenção cutânea *ex vivo* para a formulação FFAN. **89**

Tabela 19: Valores obtidos para o FPS *in vivo/in vitro*, e proteção UVA *in vitro* para as formulações FFAN e FFE. **97**

Tabela 20: Variação dos parâmetros avaliados no estudo de eficácia clínica das formulações FFE e FFAN após 0, 28, 56 e 84 dias de tratamento..... **101**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	Antioxidante
BEMT	Bis-ethylhexymetoxypheyl triazine
CAEC	Conteúdo Aquoso do Estrato Córneo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEM	Dose Eritematosa Mínima
DHHB	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate
DMC	<i>Dimethylmetoxy Chromanol</i>
DMP	Dose Mínima Pigmentária
DPPH	<i>1,1-difenil-2-picrilhidrazil</i>
D+E	Derme + Epiderme
EC	Estrato Córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
EHT	Ethylhexyl triazone
ERO	Espécies Reativas ao Oxigênio
FFE	Formulação veículo acrescida de filtros solares
FFAN	Formulação veículo acrescida de filtros solares, <i>Spirulina</i> e DMC-NLS
FPS	Fator de Proteção Solar
FP-UVA	Fator de Proteção UVA
FR	Formação Radicalar
FVE	Formulação veículo estudada
FVN	Formulação veículo acrescida de DMC-NLS
IPd	Índice de Polidispersividade
IV	Infravermelho
MBBT	Methylenebis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol
MCR	Microscópio Confocal Raman
MFA	Microscópio de Força Atômica
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NLS-DMC	<i>Dimethylmetoxy Chromanol</i> encapsulado em Nanopartículas Lipídicas Sólidas
PAE	Pixels de Alta Ecogenicidade
PBE	Pixels de Baixa Ecogenicidade
PCA	<i>3-carboxi-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi</i>

PT	Pixel Total
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
TEWL	Perda Transepidérmica de Água
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 A PELE E A RADIAÇÃO SOLAR.....	5
2.1.1 O espectro da radiação solar.....	5
2.1.2 A pele humana e os efeitos da radiação solar.....	7
2.1.3 Mecanismos fisiológicos de proteção contra a radiação solar	12
2.2 FOTOPROTEÇÃO.....	13
2.2.1 Protetores solares e regulamentação no Brasil.....	13
2.2.2 Controvérsias sobre FPS e uso do protetor solar	17
2.2.3 Formulação de protetores solares	20
2.2.4 O papel dos antioxidantes.....	23
2.3 NANOTECNOLOGIA EM PRODUTOS COSMÉTICOS	25
2.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS.....	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	32
4.1.1 Matérias-primas e Reagentes	32
4.1.2 Equipamentos e Acessórios	33
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Desenvolvimento das formulações objeto de estudo.....	35
4.2.1.1 Formulação do Protetor Solar	35
4.2.1.2 Formulação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	38
4.2.2 Estudos preliminares de estabilidade física	41
4.2.3 Avaliação do comportamento reológico	41
4.2.4 Padronização do método de quantificação.....	43
4.2.5 Estudos <i>ex vivo</i> de penetração cutânea em pele de orelha de porco	47
4.2.5.1 Penetração cutânea usando células de difusão de Franz.....	47
4.2.5.1.1 Estudo <i>ex vivo</i> da penetração cutânea	48
4.2.5.1.2 Estudo <i>ex vivo</i> de retenção cutânea por “ <i>tape striping</i> ”	48
4.2.5.2 Penetração cutânea por Microscopia Confocal Raman	49
4.2.6 Avaliação da eficácia <i>ex vivo</i> por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	51
4.2.6.1 Espectroscopia de RPE	51
4.2.6.2 Determinação do potencial antioxidante	51
4.2.6.3 Avaliação <i>ex vivo</i> da formação radicalar	52
4.2.7 Avaliação do FPS e da proteção UVA <i>in vitro</i>	53
4.2.8 Análise estatística	54

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	55
5.1 Determinação do FPS <i>in vivo</i>	56
5.2 Avaliação da eficácia clínica <i>in vivo</i>	57
5.2.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo	58
5.2.2 Determinação da perda transepidérmica de água	59
5.2.3 Determinação da espessura e ecogenicidade da derme	60
5.2.4 Determinação das propriedades mecânicas da pele	61
5.3 Avaliação sensorial da formulação fotoprotetora.....	62
5.4 Análise estatística.....	63
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1 Desenvolvimento da formulação fotoprotetora.....	65
6.2 Desenvolvimento, caracterização e estabilidade das NLS.....	66
6.2.1 Desenvolvimento e caracterização das NLS.....	66
6.2.2 Estudo preliminar da estabilidade física das NLS	71
6.3 Estudos preliminares de estabilidade da formulação fotoprotetora.....	72
6.4 Avaliação do comportamento reológico.....	74
6.5 Padronização do método de quantificação	81
6.6 Estudos <i>ex vivo</i> da penetração cutânea da formulação.....	87
6.7 Avaliação da eficácia <i>ex vivo</i>	92
6.7.1 Determinação do potencial antioxidante	92
6.7.2 Avaliação <i>ex vivo</i> da formação radicalar	92
6.8 Determinação do FPS <i>in vivo/in vitro</i> e avaliação da proteção UVA <i>in vitro</i>	97
6.9 Avaliação da eficácia clínica <i>in vivo</i>	99
6.9.1 Avaliação da função de barreira da pele.....	102
6.9.2 Espessura e ecogenicidade da derme	104
6.9.3 Propriedades mecânicas da pele.....	108
6.10 Avaliação sensorial da formulação fotoprotetora	112
7. CONCLUSÃO	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXO I - PROTOCOLO CEP-FCFRP Nº. 315	130

1. Introdução

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR10520 e NBR 14724:2011.

Fotoproteção pode ser definida como um conjunto de medidas profiláticas e terapêuticas, visando a proteção contra os efeitos negativos causados pela exposição à radiação solar (SCHALKA *et al.*, 2014). Esses efeitos negativos têm sido, por muito tempo, associados à proteção apenas contra os danos provocados pela radiação ultravioleta (UV), especificamente, UVA e UVB. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que a radiação visível (VIS) e infravermelho (IV), especialmente aquela na região IVA, também podem promover danos significativos à pele (SCHROEDER *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2009; ZASTROW *et al.*, 2009; KRUTMAN *et al.*, 2012; RANDHAWA *et al.*, 2015). Os principais efeitos provocados após exposição à radiação solar são: câncer de pele, queimaduras solares e fotoenvelhecimento cutâneo; devido aos danos diretos causados ao DNA e à geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) (POLEFKA *et al.*, 2012; DUPONT *et al.*, 2013; AKHALAYA *et al.*, 2014; NATARAJAN *et al.*, 2014). Considerando isto, medidas de fotoproteção incluem o uso de roupas, chapéus e óculos específicos para proteção solar; não se expor ao sol entre 11-16 horas e o uso de fotoprotetores tópicos e orais, sendo que o uso correto de protetores solares constitui a forma mais eficaz para garantir uma adequada proteção solar (SCHALKA *et al.*, 2014).

De acordo com a legislação brasileira, protetores solares são produtos cosméticos, classificados como Grau 2, que oferecem proteção apenas contra os raios UVA e UVB. Sua eficácia deve ser determinada através de testes *in vivo* e *in vitro* do FPS e FP-UVA (BRASIL, 2012b). No entanto, atualmente, tem-se sugerido que uma fotoproteção eficiente não deve ser limitada à proteção apenas contra a radiação UV, mas também deve incluir proteção contra a radiação VIS e IV, em vista dos danos que podem causar (DUPONT *et al.*, 2013; AKHALAYA *et al.*, 2014; GREYER-BECK *et al.*, 2014). Apesar de todo o esforço neste sentido, ainda não existem métodos internacionalmente padronizadas para a avaliação do dano causado nestas regiões e, muito menos, para avaliar a proteção oferecida por um protetor solar contra estes danos. O que tem sido demonstrado é que a incorporação de antioxidantes (AO) à formulações fotoprotetoras pode fornecer maior proteção nas regiões do VIS e IV, devido à neutralização das ERO's produzidos pela radiação solar (HAYWOOD *et al.*, 2003; SCHROEDER *et al.*, 2008; DARVIN *et al.*, 2011; MEINKE *et al.*, 2013; SCHALKA *et al.*, 2014). Portanto, uma associação entre filtros solares e AO pode ser eficaz em potencializar o efeito fotoprotetor em todo o espectro da radiação solar.

No entanto, ao contrário dos filtros solares, que devem ficar retidos na superfície da pele para oferecer adequada proteção, os AO devem penetrar a epiderme viável e derme para neutralizar eficientemente as ERO's (CHEN *et al.*, 2012). Neste sentido, a encapsulação destas substâncias em Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), além de aumentar sua estabilidade na formulação, pode aumentar a penetração cutânea do AO através da pele. Ainda, é relatado que NLS apresentam um efeito sinérgico com os filtros solares, podendo aumentar a proteção na região UV (WISSING & MULLER, 2001).

Neste contexto, foi proposto o desenvolvimento e a avaliação da eficácia clínica de um protetor solar contra os danos gerados em todo o espectro da radiação solar. O protetor solar estudado contém além de filtros UVA e UVB, uma combinação dos antioxidantes *Spirulina* e *dymethylmetoxy chromanol* (DMC). *Spirulina* é uma microalga verde obtida por processos biotecnológicos e que apresenta uma rica composição em pro-vitamina A, vitaminas B, proteínas e polissacarídeos, com ótimo potencial antioxidante, além de auxiliar na manutenção da eudermia da pele (LI *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2005). O DMC é um antioxidante sintético análogo ao gama-tocoferol (Vitamina E), capaz de neutralizar ambas as espécies reativas ao oxigênio (ERO's) e ao nitrogênio (ERN's), o que representa uma grande vantagem comparada aos outros AO, que são capazes de reagir apenas contra um destes radicais (LIPOTEC, 2005).

Logo, neste trabalho será discutido como estes compostos juntos são capazes de proteger a pele contra os danos causados pelas radiações UVA/UVB, VIS e IV, além de se avaliar a vantagem desta associação na melhora das condições da pele. Para tanto, foram usadas técnicas avançadas como Microscopia Confocal Raman e espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), respectivamente, para fornecer informações sobre o perfil de penetração e formação radicalar *ex vivo* na pele após radiação solar; além das técnicas de biofísica e análise de imagem da pele, que permitem uma avaliação completa sobre os efeitos das formulações na pele humana em condições reais de uso. Para que, desta forma, fosse possível prever a proteção oferecida pela protetor solar desenvolvido em toda a região do espectro solar.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A PELE E A RADIAÇÃO SOLAR

2.1.1 O espectro da radiação solar

A energia do sol é emitida na forma de ondas eletromagnéticas de distintos comprimentos de onda, que variam de 290 à 3000 nm e inclui a radiação ultravioleta (UV) (UVC: 200-280 nm, UVB: 280-320 nm e UVA: 320-400 nm); a radiação visível (VIS: 400-760 nm) e a radiação infravermelha (IV) (IVA: 760-1440 nm e IVB: 1440-3000 nm) (SCHALKA *et al.*, 2014; AKHALAYA *et al.*, 2014).

A radiação solar remove diferentes efeitos nocivos à pele humana. A radiação IV é sentida na forma de calor, a VIS através das cores detectadas pelo sistema óptico e a UV através de reações fotoquímicas (FLOR *et al.*, 2007). Da energia total da radiação solar que atinge a superfície da Terra ($\approx 100 \text{ mW/cm}^2$), 6,8% corresponde à radiação UV (0,5% UVB; 6,3% UVA), 38,9% à radiação VIS e 54,3% à radiação IV (KRUTMANN *et al.*, 2012; AKHALAYA *et al.*, 2014). A radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio e, portanto, não atinge a superfície da Terra, enquanto 90% da radiação UVB é absorvida pelo ozônio da estratosfera, e a radiação UVA passa para a atmosfera sem quase ser absorvida. Este último ainda pode ser dividido em UVA II, ou UVA curto, (320-340 nm) e UVA I, ou UVA longo, (340-400 nm). Consequentemente, a depleção da camada de ozônio têm levado a um substancial aumento da transmissão da radiação solar à superfície da Terra (LIU *et al.*, 2012; SCHALKA *et al.*, 2014).

A incidência da radiação solar na superfície da Terra depende de vários fatores, como latitude, altitude, estação do ano e hora do dia. A radiação é maior quanto mais próximo ao Equador, sendo que a cada grau de latitude em direção ao Equador acrescentam-se mais 3% de incidência da radiação solar. A cada 300 m acima do nível do mar, somam-se mais 4% na sua incidência. Além disso, a radiação solar apresenta maior intensidade no verão, sendo que a maior quantidade de energia solar alcança a Terra entre 11h e 16h. Especificamente com relação à radiação UVB, maior incidência ocorre entre 10h e 14 horas, ao passo que a radiação UVA apresenta incidência constante ao longo do dia, conforme ilustrado na Figura 1. Desta forma, a exposição solar entre estes horários deve ser evitada, pois corresponde aos maiores índices da radiação UV (WANG *et al.*, 2010; SCHALKA *et al.*, 2014).

Figura 1: Variação da incidência das radiações UVA e UVB ao longo do dia. Área X: horário de menor incidência da radiação UV; Área Y: horário de maior incidência da radiação UV.

Fonte: WANG *et al.*, 2010

No Brasil, a incidência da radiação solar é elevada ao longo de todo o ano. Levando em conta a posição geográfica, as regiões do Norte e Nordeste apresentam a maior dose cumulativa, o que significa que nestas regiões os níveis da radiação solar são elevados e variam muito pouco durante o ano. Por outro lado, nas regiões do Sul e Sudeste, o efeito das estações do ano são mais perceptíveis e a incidência da radiação solar apresenta maiores variações entre o inverno e o verão (CORREA & PIRES, 2013; SCHALKA *et al.*, 2014). Segundo recomendações da OMS (Organização Mundial da Saúde), a dose diária recomendada para a radiação UV que uma pessoa pode ser expor é de 108 J/m². A radiação UV observada em São Paulo (SP), Ilhéus (BA) e Itajubá (MG), durante o inverno, entre 2005 e 2009, demonstrou que as médias diárias de radiação UV são similares nestas regiões, em torno de 3300 a 3800 J/m², com menor variação na região Norte, comparada com a região Sul. No verão, esta dose foi ainda maior e alcançou valores de até 7000 J/m² (CORREA & PIRES, 2013). Isto significa que, mesmo no inverno, as pessoas estão expostas à uma dose da radiação muito maior que a recomendada pela OMS.

2.1.2 A pele humana e os efeitos da radiação solar

A pele humana desempenha uma importante função de proteção do organismo contra agentes externos, inclusive contra a radiação solar, sendo um órgão complexo, composto por três tecidos estruturais e funcionalmente distintos: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais externa e é composta principalmente por queratinócitos, que passam por um processo vertical de diferenciação, formando o epitélio escamoso estratificado, composto pelas camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e estrato córneo (EC). O último passo da diferenciação dos queratinócitos leva à formação do EC, a camada mais externa da pele e principal responsável pela proteção contra as agressões externas. Na epiderme, também se encontra os melanócitos, responsáveis pela síntese da melanina; células de *Langerhans*, que são as células imunes e as células de *Merkel*, receptoras do tato, ligadas às terminações nervosas (CHUONG *et al.*, 2002; STIEFEL & SCHWACK, 2015; MARIONNET *et al.*, 2015).

A derme é a região onde se encontra o tecido conjuntivo de suporte localizado entre a epiderme e o tecido subcutâneo subjacente. É um tecido fibroso e elástico responsável pela flexibilidade e resistência da pele; contém apêndices tais como as glândulas sudoríparas, os folículos pilosos e, também, os vasos sanguíneos e linfáticos. A derme é constituída por fibroblastos, responsáveis pela produção das proteínas da matriz extracelular (como colágeno, elastina e proteoglicanas estruturais), e pelas células do sistema imunológico, tais como mastócitos e macrófagos (CHUONG *et al.*, 2002; STIEFEL & SCHWACK, 2015; MARIONNET *et al.*, 2015).

Cada comprimento de onda da radiação solar tem uma frequência e um nível de energia associado, de forma que quanto menor o comprimento de onda, maior a energia da onda eletromagnética e, portanto, está mais propenso a gerar danos à pele e à saúde humana (NEVES, 2008). Além disso, a profundidade de penetração das ondas eletromagnéticas na pele é guiada pelo seu comprimento de onda, sendo que curtos comprimentos de onda, como a radiação UVB, alcançam apenas a epiderme, enquanto longos comprimentos de onda, como a radiação IV, conseguem alcançar até o tecido subcutâneo (BRULS *et al.*, 1984; STIEFEL & SCHWACK, 2015; SARGENT & TRAVERS, 2016). Consequentemente, as diferentes regiões do

espectro solar promovem efeitos distintos à pele, sendo que a radiação UVB, é a mais deletéria entre elas.

A radiação UV é responsável pela maioria das mudanças fotocutâneas provocadas na pele. Como a radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio, os efeitos biológicos da radiação UV são primariamente provocados pelos raios UVA e UVB. Os efeitos da radiação UV estão relacionadas ao ocasionamento do eritema (queimaduras solares), pigmentação da pele, fotoenvelhecimento, alterações do sistema imune e câncer de pele, sendo que a radiação UVB é completamente carcinogênica após exposição prolongada (POLEFKA *et al.*, 2012; KRUTMANN *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2014; SARGENT & TRAVERS, 2016). Sabe-se que a radiação UV é o agente cancerígeno ambiental mais onipresente, podendo ocasionar câncer de pele melanoma e não-melanoma (SARGENT & TRAVERS, 2016). Estes cânceres de pele têm atingido proporções epidêmicas e as taxas de morbidade e mortalidade associadas à exposição à radiação UV têm sido substanciais. Segundo dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), esperam-se aproximadamente 175 mil novos casos de câncer não melanoma no Brasil em 2016. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, mas sua incidência é baixa, estimando aproximadamente 6 mil novos casos em 2016 (INCA, 2016).

A radiação UVB, apesar de não penetrar a pele tão profundamente quanto a UVA, possui maior energia e, portanto, promove mais danos à saúde humana. Os raios UVB atingem apenas a epiderme, causando danos diretos às células e ao DNA, o que promove uma série de mutações e carcinoma à nível basal à longo prazo. À curto prazo, a radiação UVB desencadeia reações agudas como o eritema (queimadura solar) e edema, devido a liberação de mediadores inflamatórios dos queratinócitos. Neste processo, dá-se uma reação inflamatória, com vermelhidão, dilatação dos vasos sanguíneos e aumento da temperatura. Esses danos estão geralmente associados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), síntese da fosfolipase citosólica A2 (cPLA2) e ciclo-oxigenase- 2 (COX-2) (FUCHS, 1998; HAYWOOD *et al.*, 2003; HERLING *et al.*, 2006; POLEFKA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2014; STIEFEL & SCHWACK, 2015; SARGENT & TRAVERS, 2016).

Um importante efeito benéfico devido à exposição à radiação UVB é a síntese da vitamina D ativa. A radiação UVB lisa a provitamina D (7-dehidrocolesterol) em

pré-vitamina D na pele (25 hidroxí-vitamina D) e, então, em vitamina D3 (colecalciferol), envolvida no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico (SAMBANDAN & RATNER, 2011; CRIADO *et al.*, 2012). Além disso, relatos na literatura têm demonstrado que a vitamina D estimula a síntese de insulina, apresenta efeitos positivos para a pressão sanguínea, previne doenças inflamatórias e diminui o risco de desenvolver câncer do colo do útero e artrite reumatoide (STIEFEL & SCHWACK, 2015). Além disso, exposição moderada ao sol também afeta o humor em algumas pessoas, influenciando em seu bem-estar (ZITTERMANN & GUMMERT, 2010).

Já a radiação UVA é mais abundante que a radiação UVB na superfície terrestre (95%) e frequentemente não causa eritema. Dependendo do tipo de pele e da intensidade da radiação recebida, o eritema causado é mínimo. A radiação UVA penetra mais profundamente na pele que a radiação UVB, atingindo a derme, onde estão localizados os vasos sanguíneos e as fibras de colágeno e elastina. Os efeitos nocivos dos raios UVA são indiretamente causados devido à formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's), que incluem o ânion superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, que podem propagar a formação de radicais livres. Esses radicais livres, por sua vez, promovem danos aos componentes celulares, incluindo lipídeos de membranas, proteínas de matriz e DNA, além de promoverem alterações no conteúdo celular e enzimático e desorganização da matriz dérmica (POLEFKA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2014; STIEFEL & SCHWACK, 2015; SARGENT & TRAVERS, 2016). As EROs desempenham um papel importante no metabolismo das proteínas da matriz extracelular, uma vez que induzem a síntese e a ativação das metaloproteinases de matriz (MMP), especificamente as MMP-1, 3 e 9, responsáveis pela degradação do colágeno intersticial e do tecido conjuntivo (NATARAJAN *et al.*, 2014). Consequentemente, a radiação UVA está mais relacionada ao fotoenvelhecimento cutâneo, por promover perda da elasticidade e firmeza da pele com o tempo, bem como dilatação dos vasos sanguíneos e aumento das células inflamatórias na derme, intensificando os sinais visíveis do envelhecimento (POLEFKA *et al.*, 2012; STIEFEL & SCHWACK, 2015). Relata-se que até 95% destes sinais são um resultado da exposição ao sol, que se manifestam como rugas profundas, padrões irregulares de pigmentação, textura irregular, flacidez e espessamento da derme e epiderme (AGBAI *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2014). Além disso, a radiação UVA é

capaz de gerar câncer de pele devido aos danos indiretos causados ao DNA, devido ao estresse oxidativo promovido pelas EROs. Além disso, alguns estudos têm relatado que os raios UVA apresentam efeito imunossupressor, o que predispõe o organismo ao surgimento de cânceres de pele (KRUTMANN *et al.*, 2012; SARGENT & TRAVERS, 2016).

Como resultado imediato da exposição à radiação UV, também podemos citar o bronzeamento, ou seja, o processo de pigmentação da pele devido ao aumento da melanina, que confere cor à pele. A radiação UVA é principalmente responsável pela pigmentação imediata e persistente da pele, devido à fotooxidação dos precursores da melanina, já presentes na epiderme. Esta reação ocorre após poucos minutos ou horas de exposição, mas são na maioria, reversíveis, de forma que o bronzeado produzido diminui em poucos dias. Já a radiação UVB resulta em uma pigmentação tardia, que ocorre na camada basal da epiderme devido a ativação da tirosinase. Desta forma os melanócitos são estimulados para formar melanina, que é transportada para os queratinócitos, particularmente para proteção do núcleo das células. Com o movimento vertical das células da epiderme, o pigmento também se move em direção ao EC, onde se tem a formação do bronzeado, que demora alguns dias e dura até algumas semanas (MAHMOUND *et al.*, 2008; BAREL *et al.*, 2009; SCHALKA *et al.*, 2014).

A radiação VIS, por sua vez, penetra até o tecido subcutâneo da pele e, de maneira similar à radiação UV, também tem sido responsável pela geração de eritema; no entanto, é necessário uma dose muito maior que a radiação UVB e os mecanismos envolvidos na formação do eritema pela radiação VIS ainda não foram completamente elucidados (MAHMOUND *et al.*, 2008). Ainda, produzem radicais livres, resultando no aumento de citocinas pró-inflamatórias e na expressão de MMPs, seguida por danos ao DNA, de forma similar os raios UVA (DUPONT *et al.*, 2013; AKHALAYA *et al.*, 2014). Além disso, tem sido demonstrado que a radiação VIS também participa nos processos de pigmentação da pele (tardio e imediato), que pode persistir por até 8 semanas, interferindo nos processos que desencadeiam alterações pigmentares, como melasma e hiperpigmentação pós-inflamatória; mas os mecanismos envolvidos nestes processos também não estão completamente elucidados (MAHMOUND *et al.*, 2008; RANDHAWA *et al.*, 2015).

A radiação IV, especialmente aquela na região IVA, também atinge até o tecido subcutâneo da pele e promove profundos efeitos biológicos na pele de forma geral

e, em especial, na camada dérmica (AKHALAYA *et al.*, 2014). Resumidamente, a radiação IVA gera ERO na mitocôndria celular, que por sua vez, desempenham um papel fundamental em iniciar um série de reações, como, por exemplo, expressão exacerbada do gene da MMP-1 e redução da expressão dos genes de colágeno (TGF- β 1), de forma similar à radiação UVA (CHO *et al.*, 2009; KRUTMANN *et al.*, 2012; DUPONT *et al.*, 2013; AKHALAYA *et al.*, 2014). Além disso, está envolvida em processos de angiogênese, levando a uma infiltração de células inflamatórias e causando dano oxidativo ao nível do DNA (SCHROEDER *et al.*, 2008; AKHALAYA *et al.*, 2014). É demonstrado que a radiação IVA interfere com as vias da apoptose, envolvidas na reparação dos danos no DNA, o que indica um potencial carcinogênico desta radiação. No entanto, são necessários mais estudos para suportar esta hipótese (SCHROEDER *et al.*, 2008; DUPONT *et al.*, 2013).

De forma geral, os danos gerados pela exposição à radiação solar são determinados pelo fototipo de pele de cada indivíduo, intensidade e frequência da exposição à radiação. O fototipo é um sistema de classificação clínica, desenvolvido por Thomas B. Fitzpatrick, baseado no relato da ocorrência de eritema e pigmentação da pele, conforme ilustrado na Tabela 1 (FITZPATRICK, 1988). O fototipo é classificado em números, que variam de I-VI, que refletem o grau de cor da pele e seu nível de sensibilidade ao dano gerado pela radiação UV. Esta classificação também tem se mostrado útil em indicar o risco de câncer de pele fotoinduzido (MARESCA *et al.*, 2015).

Tabela 1: Classificação dos fototipos de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988).

Fototipo	Característica	Sensibilidade ao sol
I-Branca clara	Sempre se queima, nunca bronzeia	Muito sensível
II-Branca	Queima com facilidade, raramente bronzeia	Muito sensível
III-Morena clara	Queima e bronzeia moderada e gradualmente	Sensível
IV-Morena moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Pouco sensível
V-Morena escura	Raramente se queima, sempre bronzeia	Pouquíssimo sensível
VI-Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

2.1.3 Mecanismos fisiológicos de proteção contra a radiação solar

A pele humana tem desenvolvido diferentes mecanismos de proteção natural contra a radiação solar. No entanto, sua eficácia só é satisfatória dentro de certos limites de exposição, fazendo com que os efeitos prejudiciais da exposição solar sejam controlados e combatidos (LACOUR & BÉANI, 2007; STIEFEL & SCHWACK, 2015). Dentre esses mecanismos pode-se citar a síntese de melanina, o espessamento da camada córnea e da epiderme, a formação do ácido urocânico, os mecanismos de reparação do DNA e a ativação de antioxidantes endógenos.

O mecanismo de proteção mais importante é a pigmentação da pele devido à formação da melanina, que age como um agente dispersante e um filtro absorvente da radiação solar até a região do VIS, formando uma barreira física e impedindo que penetrem através da epiderme e causem dano. Desta forma, a radiação solar estimula a melanogênese, que é a síntese de melanina no interior dos melanócitos, à partir da tirosina, devido à ação da enzima tirosinase, conforme discutido anteriormente (BAREL *et al.*, 2009; SCHALKA *et al.*, 2014; NATARAJAN *et al.*, 2014; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

Após exposição excessiva à radiação solar, a atividade enzimática da histidinase também aumenta. Como resultado, os queratinócitos do EC aumentam a síntese do ácido urocânico (AUC) à partir da histidina. O AUC absorve na região UVA I através de um processo de isomerização, sendo que o isômero cis-AUC é excretado através do suor. Por muito anos, o AUC foi usado como filtro solar em protetores solares. No entanto, a forma cis-AUC apresenta potente efeito imunossupressor no organismo, através da produção de radicais livres, levando a danos oxidativos ao nível do DNA. Consequentemente, o seu uso foi proibido nestes produtos e os reais efeitos do AUC ainda é causa de discussão (LACOUR & BÉANI, 2007; SCHALKA *et al.*, 2014; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

Outro mecanismo de proteção é a hiperqueratose, estimulada principalmente pela radiação UVB. Sobre estas circunstâncias, as células da camada basal da epiderme são estimuladas e se proliferam, o que promove o espessamento do EC. Este mecanismo funciona como uma proteção natural da pele, uma vez que dificulta a penetração dos raios solares através do EC. Quando a exposição à radiação solar é cessada, o processo da hiperqueratose desaparece (LACOUR & BÉANI, 2007; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

Ainda, existem mecanismos de defesa como as enzimas ABC exinuclease, DNA polimerase I e DNA ligase, que são capazes de identificar, cortar e substituir sequências defeituosas do DNA. Quando estes mecanismos não ocorrem com adequada eficiência, as células acumulam mutações que poderão conduzir ao aparecimento do câncer de pele. Para células muito danificadas, que sofreram queimaduras solares, um processo de apoptose é iniciado como um mecanismo de proteção. Há ainda o sistema *redox* endógeno, como a ubiquinona, a glutathione, o β -caroteno e o α -ácido lipóico, que têm um efeito antioxidante e reagem eficientemente contra os radicais livres antes que eles possam causar danos ao DNA e demais componentes celulares. No entanto, a quantidade dessas substâncias produzidas pelo organismo é rapidamente esgotada após excessiva exposição à radiação solar devido a formação de radicais livres (LACOUR & BÉANI, 2007; POUILLOT *et al.*, 2011; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

2.2 FOTOPROTEÇÃO

Uma vez que todos esses mecanismos endógenos de proteção são limitados, torna-se evidente a necessidade de conferir uma fotoproteção adequada a cada tipo de pele sempre que há exposição ao sol. Uma fotoproteção adequada envolve medidas que devem ser adotadas para minimizar os efeitos prejudiciais do sol, e incluem intervenções junto a população promovendo o uso de roupas, chapéus e óculos específicos para proteção solar; e o uso correto de fotoprotetores (CORREA, 2012; SCHALKA *et al.*, 2014). Atualmente, o uso de protetores solares é a alternativa mais eficaz para prevenção dos danos causados pela radiação solar, inclusive contra o câncer de pele e, portanto, deve ser um produto tecnicamente bem formulado e, preferencialmente, deve oferecer proteção em todo o espectro da radiação solar (SCHALKA *et al.*, 2014; SARGENT & TRAVERS, 2016).

2.2.1 Protetores solares e regulamentação no Brasil

Protetores solares constituem a primeira linha de prevenção e proteção da pele contra os danos causados pelo sol. São formulados em diferentes formas

cosméticas, para uso corporal e facial, destinados a diminuir a incidência da radiação solar que atinge a pele e, conseqüentemente, os danos causados ao organismo. Para além dos efeitos nocivos induzidos pelo sol, o fotoenvelhecimento pode, igualmente, ser prevenido, bem como a ocorrência de padrões irregulares de pigmentação da pele (BAREL *et al.*, 2009; CORREA, 2012; HAN *et al.*, 2014).

De acordo com a RDC n° 30 de 1 de junho de 2012, um protetor solar é definido como sendo *“qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação solar UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação”* (BRASIL, 2012b). Segundo a RDC n° 7 de 10 de fevereiro de 2015, protetores solares são classificados como produtos cosméticos de Grau 2, ou seja, devem ser comprovados a segurança e eficácia do produto final junto à ANVISA, antes de sua comercialização (BRASIL, 2015).

Os protetores solares apresentam em sua composição, substâncias categorizadas como filtros solares. A Resolução RDC n° 69, de 23 de março de 2016 (BRASIL, 2016) aprova a lista de filtros ultravioletas permitidos para uso em produtos cosméticos, bem como sua concentração máxima de uso e define os filtros solares como *“substâncias que, quando adicionadas aos produtos para proteção solar, tem a finalidade de filtrar certos raios ultravioletas visando proteger a pele de certos efeitos danosos causados por estes raios”* (BRASIL, 2016). Portanto, é a partir dessa RDC que os formuladores devem observar os filtros solares que podem ser utilizados quali e quantitativamente em formulações fotoprotetoras. Os filtros solares constantes nessa lista são considerados seguros para uso na composição de um produto fotoprotetor.

Portanto, para que um protetor solar apresente proteção adequada, este deve ser um produto seguro e eficaz. De acordo com a RDC n° 30, a eficácia de um protetor solar deve ser avaliada pela determinação dos valores do Fator de Proteção Solar (FPS), Fator de Proteção UVA (FP-UVA) e comprimento de onda crítico (λ_c). Ainda segundo esta legislação, os protetores solares comercializados no Brasil devem possuir um FPS de, no mínimo, 6; FP-UVA igual à um terço ($1/3$) do valor do FPS e λ_c de, no mínimo, 370 nm (BRASIL, 2012b).

O valor do FPS é um índice numérico indicado no rótulo do produto, usado pelos consumidores como um indicador do grau de proteção oferecido pelo produto. É definido como uma razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM) da

pele protegida pelo protetor solar, aplicado na quantidade de 2 mg/cm², e a Dose Eritematosa Mínima da pele não protegida, conforme Eq. 1 (SCHALKA & REIS, 2011; BRASIL, 2012b):

$$FPS = \frac{DEM \text{ (pele protegida)}}{DEM \text{ (pele desprotegida)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

De acordo com a RDC n° 30, DEM é definida como sendo a “dose mínima de radiação UVB requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 a 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta, de acordo com a metodologia adotada”. Portanto, é importante destacar que o valor do FPS é uma medida de proteção apenas na região UVB. Segundo esta RDC, a determinação do FPS deve ser realizada por métodos *in vivo*, aplicando estritamente os guias atualizados disponibilizados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*) (BRASIL, 2012b).

Já o FP-UVA, como o próprio nome já diz, oferece uma medida da proteção na região UVA. A ANVISA recomenda que a determinação do FP-UVA seja realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro* reconhecidos e devidamente validados, e devem seguir, respectivamente, o guia do *Japanese Cosmetic Industry Association* e o guia disponibilizado pela COLIPA. De acordo com o primeiro guia, o FP-UVA *in vivo* é determinado pela razão entre a dose mínima pigmentária em uma pele protegida por um protetor solar (DMPp) e a dose mínima pigmentária na mesma pele quando desprotegida (DMPnp), conforme Eq. 2, chamada de metodologia PPD (*Peristent Pigment Darkening*). A RDC n° 30 define Dose Mínima Pigmentária (DMP) como sendo a dose mínima de radiação UVA requerida para produzir um escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas claramente definidas, observado entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA (BRASIL, 2012b).

$$FPUVA = \frac{DMPp}{DMPnp} \quad (\text{Eq. 2})$$

O método *in vitro* para determinação do FP-UVA foi desenvolvido na tentativa de se aproximar ao máximo às condições do teste *in vivo* pela metodologia PPD, de modo a tentar se obter um valor de FP-UVA consistente com o obtido *in vivo*. O

objetivo desta metodologia é determinar o FP-UVA *in vitro*, antes e após a irradiação, correlacionando com o valor do FPS obtido *in vivo*. O teste é feito em um substrato que mimetiza a rugosidade da pele (normalmente uma placa de polimetilmetaacrilato - PMMA), onde é aplicado o produto e irradiado com um simulador solar, e a transmitância da radiação através deste substrato é determinado espectrofotometricamente. Como resultado complementar tem-se a razão FPS/FPUVA, à partir do valor de FPS *in vivo*; a razão UVA/UVB e o comprimento de onda crítico (COLIPA, 2011).

O comprimento de onda crítico corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva, obtido à partir do espectro de absorção de um protetor solar entre 290 e 400 nm, é igual a 90% da área integrada (BRASIL, 2012b). A razão UVA/UVB corresponde à relação entre a área sob a curva na faixa UVA (320-400nm) e na faixa UVB (290-320nm) (DIFFEY, 1994). O nível de proteção oferecido pelo fotoprotetor na faixa UVA, determinado por meio da razão UVA/UVB, pode ser classificado através do *Boot's Star Rating System*, o qual estabelece uma classificação do nível de proteção UVA baseada em estrelas (Tabela 2) (BOOTS THE CHEMISTS, 2004).

Tabela 2: Classificação de acordo com o *Boot's Star Rating System* da proteção UVA (BOOTS THE CHEMISTS, 2004).

Razão UVA/UVB	Classificação <i>Boot's Star</i>	Proteção UVA
0 - 0,20	-	Ausente
0,21 - 0,40	*	Mínima
0,41 - 0,60	**	Moderada
0,61 - 0,80	***	Boa
0,81 - 0,90	****	Superior
> 0,91	*****	Ultra

Além dos métodos *in vivo* e *in vitro* utilizados na determinação do FPS e do FP-UVA, existem metodologias *in silico*, como o software BASF *Sunscreen Simulator*, o qual permite realizar uma estimativa do FPS, da proteção UVA e da relação UVA/UVB oferecida pelo fotoprotetor, de acordo com a combinação e a concentração dos filtros solares selecionados e com a quantidade aplicada (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg/cm²) (HERZOG & OSTERWALDER, 2011). Apesar de não serem aceitos para fins de registro do fotoprotetor, podem ser úteis como ferramenta de triagem durante o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e têm sido

utilizadas como ponto de partida para o desenvolvimento de protetores solares, pois permite ao formulador testar quali e quantitativamente diferentes combinações de filtros solares.

2.2.2 Controvérsias sobre FPS e uso do protetor solar

O primeiro relato acerca da avaliação da eficácia dos protetores solares foi feito por Friedrich Ellinger em 1934, em que o autor realizava a determinação da Dose Eritematosa Mínima na pele protegida e não protegida. Em 1978, a agência regulatória norte-americana (FDA) propôs a primeira normatização para a determinação do FPS, e que é utilizado até hoje como a principal forma de avaliar a eficácia de um protetor solar (FDA, 1978; SCHALKA & REIS, 2011).

Em 1993 a FDA publicou o valor de FPS máximo sugerido igual a 30, baseado na justificativa de que o ganho proporcional da absorbância de um determinado protetor solar é reduzido drasticamente quando o valor do FPS fica acima de 30, conforme demonstrado na Tabela 3 (FDA, 1993; SCHALKA & REIS, 2011). No entanto, este assunto é, ainda hoje, bastante controverso na literatura. Em 2009, OSTERWALDER & HERZOG (2009), demonstraram que o raciocínio matemático proposto anteriormente poderia ser realizado de forma inversa, ao se analisar o quanto de energia passa pelo protetor (transmitância) ao invés do quanto de energia que é absorvida pelo protetor (absorbância). Ao aplicar este raciocínio, percebe-se que a quantidade de energia que passa através do protetor solar de FPS 60 e que, portanto, atinge a pele, seria a metade daquela transmitida pelo protetor de FPS 30. Assim, a proteção oferecida pelo produto FPS 60 seria o dobro daquela oferecida pelo produto com FPS 30, conforme pode-se verificar na Tabela 3 (OSTERWALDER & HERZOG, 2009; SCHALKA & REIS, 2011).

Tabela 3: Relação entre absorvância e transmitância *versus* FPS. Adaptado de SCBALK & REIS (2011).

FPS	Absorvância (%)	Transmitância (%)
2	50,00	50,00
4	75,00	25,00
8	87,50	12,50
15	93,33	6,67
30	96,67	3,33
60	98,33	1,67

Baseado nestas discussões, em 2011 a FDA decidiu aumentar o FPS máximo para 50 (FDA, 2011), mas em maio de 2016, afirmaram não ter dados suficientes para demonstrar que protetores solares com FPS superior a 50 promovam proteção adicional comparado com os produtos com FPS igual a 50 (FDA, 2016).

Além disso, é importante destacar o fato de que a maioria da população faz o uso inadequado dos protetores solares, principalmente com relação à quantidade do produto que deve ser aplicada na pele, a uniformidade e a frequência de aplicação. Para garantir que o protetor solar apresente o mesmo fator de proteção que o determinado no teste *in vivo* do FPS, esses produtos devem ser aplicados na quantidade de 2,0 mg/cm², e devem ser reaplicados a cada 2 horas. No entanto, estudos têm demonstrado que a população aplica, em média, apenas um quarto (1/4) desta dose e, neste caso, a proteção atingida pelos usuários é menor do que a apresentada no rótulo do produto (BAREL *et al.*, 2009; CORREA, 2012; SCHALKA *et al.*, 2014; SCHALKA & REIS, 2011).

Ainda, se discute na literatura a influência do uso de protetores solares sobre a síntese de Vitamina D. Vários estudos comprovam que o uso prolongado de protetores solares tem pouco ou nenhum efeito nos níveis de vitamina D no organismo humano. Não existe um consenso sobre a concentração sérica ideal de vitamina D, mas estudos têm sugerido que exposição solar entre 20-30 minutos por dia até às 10 horas da manhã, três vezes na semana, é suficiente para manter níveis normais desta vitamina no organismo (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005; LIM, 2008; SCHALKA & REIS, 2011). Além disso, o efeito estrogênico dos filtros solares também é controverso e não está bem definido até este momento. Os estudos com modelos experimentais que comprovam esse efeito utilizaram quantidades muito

maiores dos filtros solares do que as utilizadas em seres humanos (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005; HEXSEL *et al.*, 2008).

Portanto, apesar das questões em torno da segurança de uso dos protetores solares disponíveis no mercado, seu uso deve ser mantido, uma vez que sua eficácia na proteção contra os danos gerados pela radiação solar são inquestionáveis. De forma que, a não utilização destes produtos, apresenta riscos maiores à saúde dos consumidores, do que sua utilização diária, conforme recomendações da OMS.

Outro ponto que tem recebido bastante destaque é o fato de que os protetores solares são desenvolvidos para proteger contra a radiação UV apenas, mas a proteção contra a radiação VIS e IV é limitada e estudos recentes têm demonstrado a importância de proteção nestas regiões também. SCHALKA *et al.* (2012) demonstraram, por meio de estudos espectrofotométricos *in vitro*, que o valor do FPS não tem nenhuma relação direta com proteção contra a radiação VIS. Sabe-se que filtros inorgânicos, devido a sua habilidade de dispersão da radiação solar, podem ser uma opção para a proteção VIS, dependendo do tamanho de suas partículas. Ainda, a incorporação de pigmentos aos protetores solares, como é o caso dos produtos com cor, também possuem a habilidade de aumentar o efeito fotoprotetor desses produtos (SHAATH, 2005). Por outro lado, ainda não existe nenhum filtro orgânico capaz de oferecer proteção contra a radiação IV. O que tem sido demonstrado é que as substâncias antioxidantes podem ser capazes de combater os danos causados por essa radiação (BAREL *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012).

A eficácia de um fotoprotetor na região do VIS tem sido avaliada por métodos espectrofotométricos, mas até o presente momento, não existe um modelo consensualmente validado na literatura e este ainda é o objetivo de alguns pesquisadores desta área (SCHALKA *et al.*, 2012). Com relação à região IV, métodos capazes de quantificar a proteção de filtros solares nesta região do espectro solar também não estão muito bem estabelecidos; existe apenas uma proposta para quantificar a habilidade de proteção contra o aumento das metaloproteinases de matriz por meio de estudos em cultura de células (SCHIEKE *et al.*, 2003). E DARVIN *et al.* (2011) e MEINKE *et al.* (2013) têm avaliado a eficácia fotoprotetora nas regiões VIS e IV através da avaliação *in vivo* e *ex vivo* da formação de radicais livres na pele após irradiação nestas regiões do espectro solar, usando

espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica baseada em um “*spin trapping*”.

2.2.3 Formulação de protetores solares

No desenvolvimento de formulações fotoprotetoras normalmente são utilizadas combinações de dois ou mais filtros solares com o objetivo de obter elevado FPS e efetiva proteção na região UVA e UVB. Para prevenir queimaduras solares e proteger a pele contra os efeitos deletérios do sol, os protetores solares devem atender alguns critérios: devem ser fotoestáveis, não serem fototóxicos e fotoirritantes, e não devem penetrar na pele (BAREL *et al.*, 2009; CORREA, 2012). Os filtros solares utilizados nessas formulações são classificados em filtros orgânicos ou filtros inorgânicos; e em filtros UVA, UVB ou UVA/UVB, dependendo da região do espectro ultravioleta em que absorvem a radiação. A maioria dos filtros solares disponíveis no mercado são filtros UVB, seguidos pelos filtros UVA/UVB e por um reduzido número de filtros UVA (BAREL *et al.*, 2009; SHAATH, 2010; CORREA, 2012).

Os filtros inorgânicos atuam refletindo ou dispersando a radiação UV e VIS, atuando como uma barreira física contra a penetração da radiação solar através da pele. Dependendo do tamanho da partícula destes filtros, pode ocorrer também a absorção da radiação. Os principais agentes inorgânicos utilizados são o óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂). O primeiro oferece proteção UVA/UVB, enquanto que o TiO₂ é um filtro apenas UVB. Esses filtros solares são recomendados para o preparo de protetores solares para o uso infantil e para pessoas com pele sensível, gestantes e também para obtenção de FPS mais elevado, uma vez que são mais seguros e fotoestáveis do que os filtros solares orgânicos (NEVES, 2008; SHAATH, 2010; CORREA, 2012).

Apesar de proporcionarem proteção efetiva contra a radiação UV, a opacidade que os óxidos metálicos conferem aos fotoprotetores representa uma desvantagem, pois contraria o apelo estético das formulações cosméticas ao dificultar sua espalhabilidade e deixar a pele com aspecto esbranquiçado. Uma alternativa para melhorar o sensorial de formulações contendo esses filtros solares é a utilização de partículas micronizadas e revestidas. Nessas versões o tamanho de partícula está

na faixa de 70 a 200 nm, reduzindo o efeito esbranquiçado deixado por esses filtros (SHAATH, 2010; CORREA, 2012).

Os filtros solares orgânicos são compostos aromáticos conjugados a um grupo carbonila e a um radical nas posições “orto” ou “para”. Frequentemente um grupo doador de elétrons é substituído nessas posições do anel aromático. Essas moléculas são capazes de absorver a radiação UV em um determinado comprimento de onda, passando para um estado excitado, de maior energia. Ao retornarem ao estado fundamental (de menor energia), emitem a energia absorvida para a atmosfera em um maior comprimento de onda (normalmente na região do VIS, IV ou UV alto), menos prejudicial à pele. Ao voltar para o estado fundamental, recuperam a capacidade de absorver a radiação UV repetidamente (fotoestabilidade) (BAREL *et al.*, 2009; SHAATH, 2010; CORREA, 2012).

Alguns filtros orgânicos, ao retornarem ao estado fundamental, sofrem uma alteração em sua estrutura química ou, até mesmo, geram um outro composto, perdendo sua eficácia fotoprotetora e aumentando o risco de gerar reações fototóxicas e fotoalérgicas. À este comportamento, chama-se fotoinstabilidade, o que representa uma das principais limitações associada aos filtros orgânicos convencionais (BAREL *et al.*, 2009; CORREA, 2012; STIEFEL & SCHWACK, 2015).

Os filtros solares orgânicos podem ser classificados, segundo a sua estrutura química em: ácido p-aminobenzóico e derivados, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, derivados da cânfora, derivados do dibenzoilmetano e antranilatos (CORREA, 2012). Atualmente, foram desenvolvidos filtros mais modernos, que oferecem proteção de largo espectro (UVA/UVB), além de uma elevada fotoestabilidade, cujo desenvolvimento é baseado no que se chama de “Regra dos 500 Da”, onde o elevado peso molecular promove uma reduzida penetração na pele. Consequentemente, tem-se um aumento na segurança e eficácia destas substâncias (STIEFEL & SCHWACK, 2015). Como exemplos, podemos citar o Tinosorb® (S e M), o Uvinul® (T150 e APlus) e o Mexoryl® (SX e XL). Desta forma, a indústria de cosméticos tem à disposição diversos filtros solares orgânicos, os quais representam a maior parte das moléculas utilizadas em protetores solares.

Cada filtro solar utilizado como ingrediente em uma formulação cosmética apresenta um pico de absorção máxima em determinado comprimento de onda: UVA, UVB ou ambas, quando se trata de um filtro de amplo espectro. Para que se

obtenha uma proteção eficaz, é necessário fazer uma combinação de diferentes tipos de filtros solares, que se complementam do ponto de vista de seu perfil de atividade espectrofotométrica (BAREL *et al.*, 2009; CORREA, 2012). Neste sentido é importante utilizar combinações de filtros solares que proporcionem proteção adequada na faixa UVA e UVB. Cada componente da associação deve ser considerado pelo seu perfil de atividade característico e a melhor combinação irá ocorrer quando forem escolhidos componentes que, em seu conjunto, produzam o espectro desejado para o produto final (KHURY & BORGES, 2013).

Além da escolha do filtros solares, os demais ingredientes de uma formulação fotoprotetora influenciam diretamente em sua eficácia final. A escolha do veículo utilizado no desenvolvimento de um protetor solar é importante para que a formulação final apresente boa aceitação por parte do consumidor e consiga um nível efetivo de FPS (CORREA, 2012; KHURY & BORGES, 2013). Os protetores solares podem ser formulados como cremes, óleos, loções, géis, sprays, entre outros. Dentre os diferentes veículos que podem ser utilizados, as emulsões óleo/água (O/A) têm sido as mais utilizadas nos últimos anos, pois possibilitam a incorporação de filtros lipo e hidrofílicos, que atuam sinergicamente, melhorando a eficácia do produto final. Além disso, emulsões O/A permitem uma melhor espalhabilidade sobre a pele e também evitam a característica gordurosa das emulsões A/O que não agradam o usuário (CORREA, 2012).

Ainda, existem as formulações do tipo gel-creme, que são emulsões do tipo O/A, com elevada porcentagem de fase aquosa e baixo conteúdo oleoso, essencialmente estabilizadas por coloides hidrofílicos. Desta forma, a incorporação desses agentes de consistência permitem a obtenção de formulações com menor conteúdo oleoso, melhor sensorial e, conseqüentemente, com maior aceitabilidade pelos consumidores. Aqui, é importante destacar o fato de que a aceitabilidade do consumidor pelo produto interfere fortemente na eficácia final do produto, que não é garantida apenas pelo valor do FPS, mas também pela quantidade e forma de aplicação do fotoprotetor (MILESI & GUTERRES, 2002; CORREA, 2012).

Considerando que os filtros solares podem ser incorporados em vários veículos, é fundamental que eles se dissolvam ou dispersem facilmente e de modo permanente nos veículos e nos seus componentes. Desta forma, permite-se a obtenção de preparações que formem um filme uniforme e homogêneo na superfície da pele, com aderência suficiente para resistirem à remoção pela água ou

transpiração (PRISTA *et al.*, 1992; MILESI & GUTERRES, 2002). Existem várias categorias de emolientes usados em protetores solares: ésteres, ceras, ácidos e álcoois graxos, óleos minerais, silicones, entre outros. Com relação aos ésteres, sabe-se que quanto maior a polaridade do emoliente, maior o poder de solubilização do filtro solar, além de aumentar a absorção do filtro na região do UV, melhorando o FPS. Ao contrário, emolientes menos polares, podem deslocar o comprimento de onda de absorbância máxima fora da faixa UV, além de possuírem pouco poder solubilizante (KHURY & BORGES, 2013). No entanto, os emolientes mais polares não são oclusivos, enquanto os emolientes não polares exercem função de barreira protetora e são capazes de reter a umidade da pele, evitando a perda transepidérmica de água. Já os silicones conferem um diferencial à formulação final, uma vez que potencializam o efeito de fotoproteção da pele por possuírem a capacidade de formarem filmes resistentes à água, além de apresentar extrema afinidade pela pele e baixíssima toxicidade, não serem gordurosos, não deixarem resíduos oleosos, fornecendo uma sensação sedosa e suave à pele, conferindo um toque seco ao produto final (MILESI & GUTERRES, 2002; CORREA, 2012; KHURY & BORGES, 2013). Neste sentido, a escolha adequado dos emolientes exerce um papel fundamental nas características finais de um protetor solar.

2.2.4 O papel dos antioxidantes

Os antioxidantes (AO) são substâncias que retardam, previnem ou reparam os danos oxidativos à uma molécula alvo gerados pelas ERO. De forma geral, protegem a pele dos radicais livres inibindo sua formação ou interrompendo sua propagação por meio de um ou mais mecanismos que ainda não são completamente entendidos, entre eles: 1) interceptação das espécies pró-oxidantes iniciais; 2) sequestro de metais pesados, prevenindo eventos de iniciação e propagação das reações que produzem radicais livres; 3) interceptação de radicais secundários os quais podem propagar reação em cadeia ou reduzir grupos oxidados; 4) reparo de macromoléculas e renovação celular (BAREL *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012).

Estas EROs, tal como já referido, podem se neutralizados por um mecanismo fisiológico de defesa do próprio organismo, os AO endógenos. No entanto, quando

este sistema endógeno se torna insuficiente para neutralizar os radicais livres e equilibrar o sistema, a utilização de AO exógenos pode estabilizar as EROs, revertendo os efeitos causados pelas espécies oxidativas (GODIC *et al.*, 2014). Neste sentido, os AO são incorporados em produtos cosméticos, nomeadamente em protetores solares, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos provocados pelas EROs induzidas pela radiação solar (BAREL *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012). Os efeitos benéficos dessa associação têm sido demonstrados em vários estudos na literatura (MATSUI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011; HAAG *et al.*, 2014; GRETHER-BECK *et al.*, 2014). Estudo realizado por HAYWOOD *et al.* (2003) demonstrou que protetores solares com amplo espectro de ação reduz apenas 55,0% da formação de radicais livres. Portanto, a aplicação tópica de AO poderia promover um benefício adicional na proteção contra a radiação solar. MATSUI *et al.* (2009) e WU *et al.* (2011) obtiveram melhores resultados na proteção contra os danos causados pela radiação UV em voluntários sadios quando uma combinação de AO e filtros solares foi utilizada.

Existe na literatura uma vasta informação sobre o potencial antioxidante de um grande número de substâncias, como Vitaminas C e E, coenzima Q10, bem como AO naturais de origem biotecnológica ou vegetal (MAIA CAMPOS *et al.*, 2006; GASPAR *et al.* 2008; BAREL *et al.*, 2009). No entanto, poucos estudos têm demonstrado a eficácia destas substâncias quando incorporadas em formulações tópicas; além disso, o desenvolvimento de formulações que combine AO e filtros solares, que garantam a eficácia de ambos, ainda é um desafio (BAREL *et al.*, 2009; SCHALKA *et al.*, 2014). Normalmente, os AO são substâncias naturalmente instáveis e devem permanecer estáveis e biodisponíveis na formulação final. Ao mesmo tempo, devem penetrar o EC e permanecer em concentrações adequadas na epiderme viável e derme, pelo menos, pelo mesmo tempo que o protetor solar deve permanecer na superfície da pele para garantir uma proteção apropriada (BAREL *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012; SCHALKA *et al.*, 2014).

Neste caso, a forma como estes produtos serão formulados irá influenciar na eficácia de todos os seus componentes e estudos clínicos devem ser realizados para garantir sua eficácia e determinar os efeitos da associação dos filtros solares e AO em condições reais de uso.

2.3 NANOTECNOLOGIA EM PRODUTOS COSMÉTICOS

Nanotecnologia é um termo genérico fundamentado na habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nanométrica. O tamanho de partícula é a propriedade que define um nanomaterial e a razão entre 10-100 nm é a mais usada para defini-lo. Mas esta definição é ainda bastante controversa na literatura. Acredita-se que a Nanotecnologia representa uma das tecnologias mais promissoras do século XXI e tem sido considerada uma nova revolução industrial (NOHYNEK *et al.*, 2007; MIHRANYAN *et al.*, 2012; BANGALE *et al.*, 2012).

No setor cosmético, as nanopartículas estão presentes em xampus, condicionadores, pastas de dentes, cremes antienvelhecimento, cremes anticelulite, despigmentantes de pele, hidratantes, pós-faciais, loções pós-barba, desodorantes, sabonetes, fotoprotetores, maquiagens de modo geral, perfumes e esmaltes. A empresa pioneira a introduzir um cosmético de base nanotecnológica, no âmbito internacional, foi a Lancôme, divisão de luxo da L'Oréal, em 1995, com o lançamento de um creme para o rosto constituído por nanocápsulas de vitamina E pura, para combater o envelhecimento da pele. No Brasil, a primeira empresa a desenvolver e colocar no mercado um nanocosmético foi o O Boticário, com um creme antienvelhecimento para a área dos olhos, fronte e contorno dos lábios, chamado Nano sérum. A formulação contém ativos como vitamina A, C e K e uma substância para despigmentação da pele.

No início dos anos 90, um novo nanocarreador, denominado Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), foi desenvolvido e utilizado na área Cosmética, como uma alternativa aos nanocarreadores já existentes, como nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Por definição, possuem tamanho de partícula entre 40-1000 nm e são formadas por um lipídio ou uma mistura de lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal (BANGALE *et al.*, 2012). Podem ser preparados a partir de lipídios de origem natural, como por exemplo, as ceras naturais com diferentes graus de purificação ou ultra refinação, como a cera de abelha, cera de carnaúba, cera de cupuaçu, entre outras; ou de origem sintética, tais como polietilenoglicol, parafina, vaselina, Gelucires®, monoestearato de glicerila, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, entre outros (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010; BANGALE *et al.*, 2012; KUMAR & RANDHAWA, 2013).

As NLS têm se destacado na área Cosmética devido às vantagens que podem oferecer. Diferentes substâncias ativas já foram nanoencapsuladas nestes sistemas como, por exemplo, a coenzima Q10 (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007), quercetina (BOSE *et al.*, 2013), idebenona (MONTENEGRO *et al.*, 2012), retinol e seus derivados (JEON *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2009), entre outros. A incorporação de substâncias ativas nas NLS melhoram sua estabilidade dentro do produto e também são capazes de controlar a sua liberação. Devido ao tamanho nanométrico, promovem um contato íntimo com o estrato córneo, com propriedades oclusivas, devido à formação de um filme sobre a pele, reduzindo a perda transepidérmica de água e, portanto, melhorando a hidratação. Consequentemente, podem ser empregadas com o objetivo de permitir que os ativos cosméticos atinjam as camadas mais profundas da pele, uma vez que podem aumentar a sua penetração através da epiderme (MIHRANYAN *et al.*, 2012; PARDEIK *et al.*, 2009). Além disso, apresentam, também, um efeito sinérgico na proteção contra a radiação solar e são capazes de melhorar a proteção aos raios UV em combinação com filtros orgânicos devido à sua característica particulada. Um estudo realizado por WISSING & MULLER (2001), demonstrou que o uso de NLS contendo Vitamina E, reduziu a quantidade de filtro nas formulações, mantendo o mesmo nível de proteção UV, determinado por metodologia *in vitro*.

O maior questionamento sobre o uso destes sistemas na Cosmetologia é sobre o perfil de penetração na pele das NLS e, consequentemente, seu potencial em causar efeitos tóxicos ao organismo (MIHRANYAN *et al.*, 2012; LABOUTA & SCHNEIDER, 2013). É relatado que partículas com tamanho superior à 20 nm normalmente não penetram através da pele intacta; e que, apesar de partículas com tamanho superior poderem penetrar mais profundamente a pele através dos folículos pilosos, não há indicação científica de que elas penetrem até os tecidos viáveis da pele (BAROLI *et al.*, 2010; MIHRANYAN *et al.*, 2012; BANGALE *et al.*, 2012). No entanto, o perfil de penetração destas nanopartículas depende de suas propriedades físico-químicas, como composição química, tamanho, conformação e morfologia, carga superficial e área total, bem como das propriedades da formulação semissólida onde são incorporadas (veículo), o que influencia em sua atividade biológica e efeitos no organismo (LABOUTA & SCHNEIDER, 2013; ZORODDU *et al.*, 2014). Portanto, cada caso deve ser avaliado de forma isolada, a fim de garantir a segurança e eficácia do produto final.

Ao contrário da Europa, onde existe uma legislação que prevê que os nanomateriais sejam pré-registrados e que o seu uso em cosméticos implica na necessidade de se realizar testes adicionais de segurança, em relação a um produto cosmético convencional, no Brasil ainda não foi estabelecida nenhuma legislação específica. Encontra-se em trâmite no Congresso Nacional a votação para o Projeto de Lei (PL) nº 6741/2013, que trata da Política Nacional de Nanotecnologia; que baseia-se nos conceitos e princípios da legislação europeia e prevê a vigilância dos bens de consumo contendo nanotecnologia.

2.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

A aplicação de um produto cosmético pode promover efeitos negativos ou positivos sobre a pele. Desta maneira, é importante definir procedimentos e métodos experimentais que sejam capazes de determinar a extensão destas alterações. Os métodos utilizados dependem dos objetivos do estudo e, geralmente, empregam várias metodologias simultaneamente, visando a comprovação científica dos reais benefícios propostos por estas formulações (ELSNER *et al.*, 2011).

Neste contexto, as técnicas de biofísica e análise de imagem da pele têm sido amplamente empregadas, por permitirem a avaliação dos produtos em suas reais condições de uso. Desta forma, é possível avaliar as características biológicas, mecânicas e funcionais da pele através de medidas objetivas de determinadas variáveis, por métodos cientificamente comprovados e não-invasivos. Dentre estas variáveis, podemos citar as propriedades mecânicas da pele (viscoelasticidade), a espessura da derme e epiderme, a hidratação cutânea, a rugosidade, o padrão de pigmentação, o grau de oleosidade (ou sebo), a perda transepidérmica de água, a avaliação do microrelevo cutâneo, entre outros (GONÇALVES & MAIA CAMPOS, 2009; ELSNER *et al.*, 2011; DRENO *et al.*, 2014).

A investigação é realizada em voluntários sadios e nas condições previsíveis de uso do produto. De maneira geral, os voluntários são selecionados de acordo com o seu tipo de pele, sexo, idade e hábitos específicos. Dependendo do tipo de produto avaliado e do efeito esperado, são selecionadas diferentes regiões corporais, desde a face, antebraços e, até mesmo, a região dos tornozelos. E a duração dos testes de eficácia pode variar desde um dia, caracterizando os estudos

de cinética de avaliação, com aplicação única do produto, até várias semanas, com várias aplicações em tempos determinados (RAWLINGS & HARDING, 2004; CHILCOTT & FARRAR, 2008).

A avaliação da eficácia de produtos cosméticos por tais métodos pode, ainda, ser complementada quando comparada com a análise dos efeitos dos produtos pelos próprios consumidores. Esta abordagem de avaliação permite correlacionar os benefícios percebidos com aqueles mensurados pelas técnicas de biofísica e imagem da pele, além de prever a aceitabilidade do produto final pelos consumidores (RAWLINGS & HARDING, 2004; GONÇALVES & MAIA CAMPOS, 2009; GIANETI *et al.*, 2012). Há uma grande variedade de estudos sobre a caracterização dos atributos sensoriais de produtos cosméticos. O método sensorial padrão utilizado para esta aplicação é a caracterização quantitativa descritiva, onde os voluntários são treinados para qualificar e quantificar os atributos sensoriais do produto. No entanto, apesar de ser amplamente aceita, esta metodologia apresenta a desvantagem de demandar tempo para a formação e treinamento das voluntárias (painel). Desta forma, uma alternativa é o método CATA (*Check-all-that-apply*), que poder ser realizado pelos consumidores, sem a necessidade de um painel treinado. Para tanto, os voluntários respondem à um questionário contendo atributos relacionados com a qualidade, intenção de compra e aceitabilidade do produto final. A desvantagem deste método, no entanto, está relacionado ao fato de que fornece frequência de citações de determinado atributo, ao invés de classificação ou intensidade do mesmo (PARENTE *et al.*, 2011; PENSÉ-LHÉRITIER, 2015).

No Brasil, o Conselho Nacional de Saúde regulamentou as pesquisas envolvendo seres humanos através da RDC nº 466 de 2012 e constituiu a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), responsável pelo registro dos Comitês de Ética em Pesquisa institucionais. Portanto, todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos devem obedecer às recomendações dessa resolução. Assim, antes da avaliação de produtos cosméticos em humanos, todo e qualquer protocolo de estudo deve ser submetido à avaliação prévia por um Comitê de Ética (BRASIL, 2012a).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a eficácia clínica de um protetor solar, contendo filtros UVA/UVB e as substâncias antioxidantes, *Spirulina* e *dimethylmethoxy chromanol* veiculado em Nanopartículas Lipídicas Sólidas, com ação fotoprotetora em toda a região do espectro solar.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver protetores solares contendo filtros solares UVA/UVB, *Spirulina* e *dimethylmethoxy chromanol* (DMC) veiculado em NLS;
- Desenvolver NLS contendo o antioxidante DMC (DMC-NLS);
- Avaliar a estabilidade física e a eficiência de encapsulação do DMC-NLS;
- Avaliar a estabilidade preliminar das formulações fotoprotetoras desenvolvidas;
- Avaliar o comportamento reológico destas formulações;
- Avaliar o potencial antioxidante das formulações;
- Avaliar a proteção contra a formação radicalar do protetor solar em todas as regiões do espectro solar;
- Desenvolver e validar um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação dos filtros solares e DMC;
- Avaliar a penetração cutânea dos filtros solares em pele de orelha de porco;
- Determinar o FPS *in vivo* e *in vitro* e a proteção UVA *in vitro* do protetor solar;
- Avaliar a eficácia clínica do protetor solar usando técnicas de biofísica e análise de imagem da pele;
- Avaliar o sensorial e a aceitabilidade das formulações estudadas.

4. Material e Métodos

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas e Reagentes

As matérias-primas utilizadas neste estudo estão descritas de acordo com o INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*), nome comercial e fornecedor/fabricante. DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) e nitróxido de PCA (*3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy*) foram comprados da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Para as análises cromatográficas foi utilizado álcool etílico grau HPLC Lichrosolv – Merck do Brasil (São Paulo, SP) e água ultrapura (Mili Q, Millipore Inc., EUA). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

- *Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer* (Pemulen TR-2[®]) - Lubrizol do Brasil Aditivos Ltda;
- *Aminomethyl propanol* (AMP 95) - Mapric (São Paulo, SP);
- *Beeswax* (Cera de abelha) - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, SP);
- *Bis-EthylhexyMetoxyphenyl Triazine* (Tinosorb S[®]), Basf (São Paulo, SP);
- *Butylated hydroxytoluene* (BHT) - Mapric (São Paulo, SP);
- *Butylene Glycol* (Butilenoglicol), Mapric (São Paulo, SP);
- *C12-15 Alkyl Benzoate* (Crodamol AB[®]), Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- *Caprylic/Capric Triglyceride* (Crodamol GTCC[®]), Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- *Carnauba wax* (Cera de carnaúba) - Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Cambuci, SP);
- *Cetearyl Alcohol, Dicetyl Phosphate (and) Ceteth-10 Phosphate* (Crodafos CES[®]), Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- *Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate* (Uvinul A Plus[®]), Basf (São Paulo, SP);
- *Dimetilmetoxi cromanol* (Lipochroman[®]) – Lipotec S.A. (Barcelona, Espanha);
- *Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt* (EDTA) - Mapric (São Paulo, SP);
- *Ethylhexyl Triazone* (Uvinul T150[®]) – Basf (São Paulo, SP);

- *Glicerín* (Glicerina bi-destilada) - Mapric (São Paulo, SP);
- *Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (and) Aqua (and) Decyl Glucoside (and) Propylene Glycol (and) Xanthan Gum* (Tinosorb M[®], 50% de substância ativa), Basf (São Paulo, SP);
- *Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) butylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben* (Phenova[®]) – Mapric (São Paulo);
- Poloxamer 407 – Via Farma Ltda (São Paulo, SP);
- *Polysorbate 80* (Span 80[®])- Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- *Propylene Glycol* (Propilenoglicol) - Mapric (São Paulo, SP);
- *Sodium Polyacrylate (and) Ethylhexyl Cocoate (and) PPG-3 Benzyl Ether Myristate (and) Polysorbate 20* (ViscOptimaTM SE[®]) - Croda do Brasil Ltda (Campinas, SP);
- *Spirulina* (Blue Green Algae), extrato seco – Ouro Fino Indústria e Comércio Ltda (Cravinhos, SP).

4.1.2 Equipamentos e Acessórios

- Agitador Mecânico 713D (Fisatom);
- Balança analítica BL 320H (Shimadzu);
- Balança eletrônica AS 2000C (Marte);
- Bisnagas de PVC opacas com capacidade para 30 gramas;
- Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R FANEM;
- Chapa de Aquecimento;
- Corneometer[®] OCM825 (Courage-Khazaka eletronic GmbH, Colônia, Alemanha);
- Coluna cromatográfica Lichrospher 100 RP-C18 (125 mm x 4.0 mm, 5µm);
- Cromatógrafo Líquido modelo UltiMate 3000 (Thermo Scientific[®], São Paulo, Brasil);
- Cutometer[®] SEM 57 (Courage-Khazaka eletronic GmbH, Colônia, Alemanha);
- Colorímetro (CM-2600d/2500d, Konica Minolta, EUA);
- DermaScan[®] C (Cortex Technology, Dinamarca);
- Dermatômetro (Dermatome – NOUVAG, Suíça)

- Detector ultravioleta de eritema-efetivo PMA 2103LLG (Solar Light Company, Philadelphia, EUA).
- Espectroscópio de Ressonância Paramagnética Eletrônica (X-band MiniScope MS400, Magnettech, Berlim, Alemanha);
- Estufas termostatzadas (modelo II FC, Eletrolab);
- Fibras UV/VIS e VIS/IV (LOT Oriel GmbH & Co. KG, Alemanha);
- Filtros do simulador solar AMO LSZ185 (massa de ar 0, espaço exterior) (LOT Oriel GmbH & Co. KG, Alemanha);
- Labsphere[®], modelo UV-1000S, Labsphere, Noth Sutton, EUA;
- Microscópio Confocal Raman (Modelo 3510, River Diagnostics, Rotterdam, Holanda);
- Microscópio de Força Atômica (Modelo SPM-9600, Shimadzu Co., Kyoto, Japão);
- Peagômetro DM 20 (Digimed);
- Placa de polimetilmetacrilato (PMMA) (Helioscience, Labsphere, EUA);
- Helioplates HD6 (Helioscience, Labsphere, EUA)
- Potes plásticos de PVC opacos, com capacidade para 20 gramas;
- Reômetro DV-III digital, tipo Cone & Placa (Brookfield), acoplado ao *software* Rheocalc[®] versão V1.01 e *spindle* CP 52;
- Sensor da radiação solar, Economic Handheld Optical Power Meter, 843-R, probe modelo 919P-003-10 (Newport Corporation, CA EUA);
- Sensor da radiação UVA/UVB ILT 1400 Radiometer Photometer, probe UVB probe #28930 e probe UVA #29123 (Polytec, Waldbronn, Alemanha);
- Simulador solar (LOT Oriel GmbH & Co. KG, Alemanha);
- Simulador solar Multiport 601 (Solar Light Company, Philadelphia, EUA);
- Tewameter[®] TM210 (Courage-Khazaka eletronic GmbH, Colônia, Alemanha);
- Tubos de ultrafiltração (Amicon[®] Ultra 100K, Millipore, Merck S/A, Irlanda)
- Turrax Turratec TE-102 (Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- Ultra-turrax – T25 Digital (IKA Works Inc, EUA);
- Vidraras em geral;
- Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Limited, Worces, Inglaterra).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento das formulações objeto de estudo

4.2.1.1 Formulação do Protetor Solar

Foram desenvolvidas formulações do tipo gel-creme à base do polímero hidrofílico *acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer* e da base autoemulsionante *cetearyl alcohol, dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate*, pelo método de inversão de fases, usando agitador mecânico. As variáveis investigadas da fase oleosa da formulação foram: concentração da base autoemulsionante, emolientes e agentes de consistência, visando a maior estabilidade da formulação fotoprotetora final e melhor sensorial, conforme indicado na Tabela 4.

Os filtros solares selecionados para este estudo foram diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBBT) e ethylhexyl triazone (EHT). Estes filtros foram escolhidos por estarem presentes na maioria dos produtos disponíveis comercialmente, serem fotoestáveis e seguros, apresentarem diferentes propriedades físico-químicas e quando, utilizados em associação, promoverem proteção na região UVA e UVB (Tabela 5). A concentração de cada filtro foi escolhida com base no FPS desejado para o produto final (FPS = 30), calculado *in silico*, usando a base de dados da Basf, *Sunscreen simulator*. Para incorporação na formulação, os filtros solares lipofílicos foram previamente solubilizados nos emolientes da fase oleosa (FO), enquanto os filtros hidrossolúveis foram previamente solubilizados na fase aquosa (FA). Cada fase da emulsão foi aquecida separadamente, até a temperatura de $60,0 \pm 2,0$ °C. A FA foi vertida sobre a FO e as formulações foram, inicialmente, agitadas à 600 rpm por 5 minutos e, posteriormente, à 1200 rpm por 20 minutos, para incorporação do polímero hidrofílico. A incorporação da microalga *Spirulina* (0,1% p/p) se deu ao final do processo de desenvolvimento, após adequada solubilização em propilenoglicol.

As formulações selecionadas para estudos posteriores foram: FVE (veículo), FFE (veículo acrescido dos filtros solares) e FFA (veículo acrescido dos filtros solares e *Spirulina*).

Tabela 4: Composição (%) das formulações desenvolvidas.

[illegible]

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos e estrutura química dos filtros diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (BEMT), methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (MBBT) and ethylhexyl triazone (EHT).

Filtro	Estrutura química	Nome comercial	Comprimento de onda máximo (nm)	Peso Molecular (Da)	Log P	Solubilidade aquosa (mg/L)
DHHB		Uvinul APlus®	311 ^a	297,5 ^b	6,2 ^b	<0,01 (20°C) ^b
BEMT		Tinosorb S®	310 to 340 ^a	627,8 ^b	5,4 ^a	<0,014 ^a
MBBT		Tinosorb M®	302 to 357 ^a	659 ^a	12,7 ^a	0,007 ^a
EHT		Uvinul T150®	314 ^d	823,07 ^c	8,1 ^c	N/A

N/A: não encontrado

^aDurand et al. (2009)

^bHaque et al. (2016)

^cHeng et al. (2014)

^dSobanska and Pyzowski (2012)

4.2.1.2 Formulação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

A. Desenvolvimento

NLS, contendo ou não, a substância antioxidante *dimethylmetoxy chromanol* (DMC), foram preparadas por meio da técnica de microemulsão à quente, proposta por FREITAS *et al.* (2015). Foram preparadas duas fases para a formação da microemulsão: uma oleosa (FO), contendo como carreador lipídico a cera de abelha, associada ou não à cera de carnaúba; e outra fase aquosa (FA), contendo água e tensoativos. Como tensoativos, foram utilizados uma combinação do polissorbato 80 (Tween 80) e poloxamer 407, correspondendo à 3,0% (p/v) do total da formulação. A composição destas fases está descrita na Tabela 6, sendo que a fase oleosa consistiu em 5% (p/v) do total da formulação.

Tabela 6: Composição (%) das NLS desenvolvidas.

Composição (%) - Nome INCI	F1	F2	F3	F4
<i>Beeswax</i>	2,5	4,5	2,5	2,25
<i>Carnauba wax</i>	2,5	-	2,5	2,25
<i>Dimethylmetoxy chromanol</i>	-	0,5	-	0,5
<i>Poloxamer 407</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Polysorbate 80</i>	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Water</i> (q.s.p.)	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Cada fase foi pesada e aquecida separadamente. Em seguida, a FA foi vertida sobre a FO, sob agitação e temperatura constantes, $70,0 \pm 2,0$ °C (para os sistemas contendo cera de carnaúba) e $60,0 \pm 2,0$ °C (para os sistemas contendo apenas cera de abelha). A microemulsão formada foi submetida ao alto cisalhamento em Ultra-turrax, pelo tempo de 5 minutos e velocidade de 20.000 rpm. Em seguida o sistema foi rapidamente resfriado em banho de gelo por, aproximadamente, 3 minutos, sob agitação manual usando bastão de vidro. NLS contendo o DMC (DMC-NLS) foram preparadas após solubilização do ativo DMC (0,5% p/v) à fase oleosa previamente fundida, seguida pela mistura da FA na FO.

B. Caracterização

As NLS desenvolvidas, contendo ou não o DMC, foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade (IPd) e potencial zeta, determinados por espalhamento dinâmico de luz usando Zetasizer Nano ZS90. Para avaliação do tamanho de partícula e potencial zeta, as amostras foram diluídas em água purificada na proporção 1:1 e 1:8, respectivamente (ZAMARIOLI *et al.*, 2015).

Análises da superfície e formato das NLS, contendo ou não o DMC, também foram determinadas após 24 horas de preparo empregando um microscópio de Força Atômica (MFA). As NLS foram diluídas em água ultrapura, espalhadas em placas de mica e secas à temperatura ambiente para posterior análise por MFA.

C. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE %) do DMC nas NLS foi determinada indiretamente avaliando-se a quantidade do ativo não encapsulado nas NLS (KANG *et al.*, 2009). Primeiramente, a suspensão das NLS, preparadas 24 antes do teste, foi diluída em água purificada (1:9) e centrifugada à 12857g por 30 min, para análise da quantidade do fármaco não-encapsulado e insolúvel na fase aquosa da suspensão. O sobrenadante contendo as NLS foi, então, descartado e adicionou-se 3 mL de álcool etílico ao precipitado a fim de solubilizar o DMC.

Além disso, a quantidade do ativo não encapsulado, mas que poderia estar solúvel na fase aquosa, foi determinada por ultrafiltração. Para tanto, 0,5 mL da dispersão das NLS foi adicionada aos tubos de ultrafiltração e centrifugado por 30 minutos à 12857 g. O sobrenadante foi seco em ar comprimido e ressuspendido em 1 mL de álcool etílico para posterior quantificação. A quantidade do ativo solúvel e insolúvel na fase aquosa da dispersão das NLS foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita no item 4.2.4. A EE (%) foi, então, determinada usando a equação 3:

$$EE (\%) = \frac{Q_t - Q_n}{Q_t} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde, Q_t é a quantidade total do ativo adicionada à NLS durante preparo e Q_n é a quantidade total do ativo não encapsulado (solúvel e insolúvel na fase aquosa). Todas as medidas foram realizadas em triplicata à partir de 3 lotes diferentes de DMC-NLS preparados nas mesmas condições de ensaio, conforme item A.

D. Estudo preliminar da estabilidade física

A formulação que forneceu NLS com tamanho de partícula mais adequado aos objetivos do estudo foi submetida à uma avaliação preliminar de estabilidade física. Para isso, 3 lotes das NLS e DMC-NLS foram produzidos nas mesmas condições citadas no item A e armazenados à $25,0 \pm 2,0$ °C e $4,0 \pm 2,0$ °C e submetidas ao estresse térmico à $37,0 \pm 2,0$ °C e $45,0 \pm 2,0$ °C, em estufas termostáticas, com controle de temperatura e umidade (70% de UR). Após 24 horas, 7, 14, 21 e 54 dias de armazenamento, o tamanho de partícula, IPd, potencial zeta e pH foram novamente avaliados para cada lote produzido, em duplicata (BRASIL, 2004). A EE (%) das NLS armazenadas à $4,0 \pm 2,0$ °C foi reavaliada após 30 dias de preparo, conforme metodologia descrita no item anterior.

E. Incorporação das NLS na formulação fotoprotetora

DNC-NLS foram incorporadas às formulações FVE e FFA, à partir de agora denominadas, FVN e FFAN, respectivamente. FVN e FFAN foram preparadas substituindo 10% (p/p) da fase aquosa das formulações FVE e FFA, por 10% (p/p) da dispersão do DMC-NLS, preparado 24 horas antes e incorporadas ao final do processo de emulsificação, sob vagarosa agitação (PARDEIKE *et al.*, 2009). A concentração final do ativo DMC no protetor solar foi de 0,05% (p/p). Estas formulações também foram acondicionadas em embalagens de plástico, hermeticamente fechadas e deixadas em repouso, em ambiente seco e protegido da luz, à temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C por 24 horas, para avaliações posteriores de estabilidade preliminar e comportamento reológico.

4.2.2 Estudos preliminares de estabilidade física

Logo após o preparo, as formulações FVE, FVN, FFE e FFAN, foram acondicionadas em embalagens de plástico, hermeticamente fechadas e deixadas em repouso, em ambiente seco e protegido da luz, à temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C por 24 horas, para avaliações posteriores da estabilidade preliminar: determinação do pH, separação de fases, aspecto macroscópico e organoléptico, conforme descrito à seguir (BRASIL, 2004).

A. Determinação do pH

As medidas do pH foram realizadas usando peagômetro digital, com eletrodo próprio para formulações semissólidas, após 24 horas, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de preparo e armazenadas em diferentes condições: $25,0 \pm 2,0$ °C, $4,0 \pm 2,0$ °C, $37,0 \pm 2,0$ °C e $45,0 \pm 2,0$ °C, em estufas com controle de umidade (70% de UR).

B. Centrifugação

Após 24 horas, 28 e 60 dias de preparo, 3,0 gramas de cada formulação estudada foi centrifugado a 604,8g (3 ciclos de 30 minutos) para avaliar se houve separação de fases.

C. Avaliação das características macroscópicas e organolépticas

As formulações foram armazenadas à $25,0 \pm 2,0$ °C e $4,0 \pm 2,0$ °C e submetidas a estresse térmico à $37,0 \pm 2,0$ °C e $45,0 \pm 2,0$ °C, em estufas com controle de umidade (70% de UR) e observadas visualmente quanto a alterações na cor, odor, separação de fases e homogeneidade, após 24 horas, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de preparo.

4.2.3 Avaliação do comportamento reológico

Após preparo, as formulações FVE, FVN, FFE e FFAN, foram mantidas à $25,0 \pm 2,0$ °C por 24 horas para determinação do comportamento reológico. Posteriormente,

foram acondicionadas em potes separados e hermeticamente fechados, e armazenadas à $25,0 \pm 2,0$ °C e $4,0 \pm 2,0$ °C e submetidas a estresse térmico à $37,0 \pm 2,0$ °C e $45,0 \pm 2,0$ °C, em estufas com controle de umidade (70% de UR) para determinação dos parâmetros reológicos após 7, 14, 21 e 28 dias de preparo (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003).

O comportamento reológico foi avaliado em reômetro Brookfield DV-III digital do tipo Cone & Placa, usando o *spindle* CP51 e 0,5 grama de amostra. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando velocidades de rotação progressivamente maiores (5,0-100,0 rpm), por 90 segundos, para se obter a curva ascendente. O mesmo procedimento foi repetido com velocidades progressivamente menores (110,0-5,0 rpm), para se obter a curva descendente, também por 90 segundos.

A integração numérica das curvas dos reogramas obtidos foi realizado usando o *Software Micronal OriginPro 8.0* e a área sob a curva foi calculada para se obter a área de histerese. Diferentes modelos matemáticos foram empregados para se caracterizar o comportamento de fluxo das formulações avaliadas: Ostwald (Eq. 4), Herchel-Bulkley (Eq. 5), Cross (Eq. 6) e Cross com *yield value* (Eq. 7):

$$\tau = K\gamma^n \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\tau = \sigma_0 + m\gamma^n \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\tau = \left[n_0 + \frac{(n_\infty - n_0)}{1 + (K_{CR} \gamma)^n} \right] \gamma \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\tau = \left[n_0 + \frac{(n_\infty - n_0)}{1 + (K_{CR} \gamma)^n} \right] \gamma + \sigma_0 \quad (\text{Eq. 7})$$

onde, σ_0 é a tensão limite de escoamento (também conhecido como *yield stress*), η_0 é a viscosidade inicial, η_∞ é a viscosidade no infinito, n é o índice de fluxo, K é o índice de consistência, τ é a tensão de cisalhamento e γ é a taxa de cisalhamento (KIM *et al.*, 2003). O modelo que melhor se ajustou a curva de fluxo ascendente, foi utilizado para avaliação dos parâmetros reológicos característicos para cada formulação.

4.2.4 Validação do método de quantificação

Inicialmente, um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa foi desenvolvido de maneira que permitisse a quantificação simultânea dos filtros solares e DMC, objetivando posterior aplicação nos estudos de penetração e retenção cutânea dos filtros solares e EE (%) do DMC-NLS. As análises foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido modelo UltiMate 3000. As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-C18 inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato. A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando o software Chromeleon[®] 7.

A condição analítica que se mostrou mais adequada foi a seguinte: fase móvel composta por uma mistura de água ultrapura acidificada com ácido fosfórico (pH $\approx$ 3,7) e álcool etílico sob fluxo por gradiente (Tabela 7) de 0,7 mL/min, detecção a 220 e 312 nm, temperatura do compartimento da coluna de 40°C, volume de injeção de 10 μ L e tempo total de corrida fixado em 30,5 min. Solução padrão dos filtros solares e DMC foram preparadas em uma solução 1:1 de álcool etílico grau HPLC e dimetil formamida (DMF), na concentração de 1,0 mg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente, à partir da solução mãe, usando a mesma solução de álcool etílico:DMF, nas concentrações de 2, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/mL. Estas soluções foram utilizadas para estabelecer a razão linear na curva de calibração de cada analito (filtros solares e DMC) (SMYRNIOTAKIS & ARCHONTAKI, 2004; SALVADOR & CHISVERT, 2005; NYEBORG *et al.*, 2010).

Tabela 7: Gradiente utilizado para separação cromatográfica por CLAE.

Tempo (minutos)	Álcool etílico (%)
0	30
6	40
8	75
9	75
11	90
12	100
17	100
17,5	75
20,5	30
30,5	30

A padronização do método de quantificação foi, então, realizada seguindo as diretrizes propostas na Resolução n° 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), para os parâmetros analíticos: seletividade, linearidade e intervalo, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. Além disso, foi realizado o estudo de recuperação dos filtros solares à partir da pele de orelha de porco e da formulação FFAN.

A. Seletividade

Foi avaliada injetando-se amostras de: **i)** tampão fosfato isotônico, pH 7,4, acrescida de 4,0% (p/v) de soro de albumina bovina fração V, acrescida de 10 µg/mL dos filtros solares; **ii)** amostra da formulação FFAN (dispersa em 10 mL de solução de álcool etílico:DMF (1:1) por 30 minutos com o auxílio de banho de ultrassom. A suspensão resultante foi centrifugada à 1641 g por 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm e injetado no cromatógrafo) e **iii)** pele de orelha de porco (amostras de 1 cm² foram picotadas e dispersas em 5 mL de álcool etílico:DMF (1:1) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Turrax Turratec TE-102). A suspensão resultante foi centrifugada à 1641 g por 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm e injetado no cromatógrafo). Os perfis cromatográficos foram comparados com os perfis dos padrões dos filtros solares e DMC em concentração conhecida para verificar a presença de possíveis interferentes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

B. Linearidade

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente, filtradas em membrana de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo, em três dias consecutivos. A média das áreas dos picos referentes a concentração das substâncias estudadas foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. As equações das retas foram expressas segundo a equação geral de regressão linear simples (Eq. 8):

$$y = ax + b \quad (\text{Eq. 8})$$

onde, o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y. Já a faixa linear de trabalho foi determinada por intermédio do coeficiente de correlação linear (R^2).

C. Limites de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

A sensibilidade do método foi determinada através do LD e LQ com base nas curvas de linearidade. As Eq. 9 e 10 foram utilizadas, respectivamente, para determinação dos LD e LQ:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$LQ = \frac{310 \times \sigma}{IC} \quad (\text{Eq. 10})$$

onde, IC é a inclinação da reta média das curvas de calibração e σ é o desvio padrão da IC .

D. Precisão

Foi avaliada em dois níveis: i) repetibilidade ou precisão intra-corrida ($n=3$ para cada concentração) e ii) precisão intermediária ou precisão inter-corridas ($n=3$ para cada concentração, em três dias consecutivos). Para tanto, foram analisadas soluções dos analitos nas concentrações de 10,0, 30,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$. A precisão foi expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR) segundo a Eq. 11:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

onde, DP é o desvio padrão, e CMD é a concentração média determinada. O valor máximo aceitável para o DPR é 5%.

E. Exatidão

Soluções de trabalho contendo os filtros solares e DMC nas concentrações de 10,0, 30,0 e 50,0 µg/mL foram analisadas em triplicata. A exatidão foi calculada usando a Eq. 12 e expressa entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Para o cálculo da Exatidão Intra-corrida, as 3 réplicas foram obtidas num mesmo experimento. Para o cálculo de Exatidão Inter-corridas, as 3 réplicas foram obtidas em três dias diferentes.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Média Teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

F. Recuperação à partir da pele de orelha de porco

O estrato córneo (EC) de cortes de pele de orelha de porco (~1 cm²) foram separados da derme e epiderme (D+E) pela técnica de “*tape stripping*”, com auxílio de fita adesiva (15 aplicações sucessivas). As fitas adesivas e o tecido, correspondente à D+E foram transferidas para tubos falcon (50 mL) e adicionados de 1000 µL de soluções etanólicas dos filtros solares em três níveis de concentração: baixa (10,0 µg/mL), média (30,0 µg/mL) e alta (50 µg/mL). Essas soluções foram deixadas em contato por 1 hora e adicionadas de 5,0 mL de solução extratora (1:1 álcool etílico:DMF). A D+E foram trituradas com auxílio de um homogeneizador de tecidos (turrax Turrtec TE-102), seguida pela extração dos ativos em banho de ultrassom por 30 minutos. Tubos falcon contendo as fitas adesivas foram agitados em vórtex por 30 minutos para permitir a extração dos filtros solares e DMC. Todos os tubos foram, então, centrifugados a 3000 rpm (985g) por 10 minutos, sendo os sobrenadantes filtrados e quantificados de acordo com o método analítico descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em triplicata. As porcentagens recuperadas dos analitos (R %) foram determinadas usando a Eq. 13:

$$R (\%) = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

G. Recuperação à partir da formulação fotoprotetora

0,01 g da formulação FFAN foi pesado em tubos falcon (50 mL) e adicionados de 10 mL de solução extratora contendo álcool etílico:DMF (1:1). Após extração dos filtros solares em ultrassom por 30 minutos, os sistemas foram centrifugados (985g por 10 minutos) e os sobrenadantes filtrados e quantificados de acordo com o método analítico descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata. As porcentagens recuperadas dos filtros solares (R, %) foram determinadas usando a Eq. 13.

4.2.5 Estudos ex vivo de penetração cutânea em pele de orelha de porco

4.2.5.1 Penetração cutânea usando células de difusão de Franz

A metodologia utilizada neste estudo foi baseada nas recomendações do *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS, 2010) segundo recomendações do guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2012c). Foi avaliada a penetração dos filtros solares à partir da formulação FFAN, usando células de difusão vertical de Franz (n=6), com área de difusão de 1,89 cm².

Foi utilizada pele de orelha de porco fornecida pelo abatedouro Olhos d'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda (Ipuã, SP, Brasil). A pele foi cuidadosamente dissecada com auxílio de um bisturi para remoção do tecido subcutâneo. As amostras de pele, livres do tecido subcutâneo, foram armazenadas a -70 °C e utilizadas dentro do período de 60 dias. No dia do experimento, a pele foi descongelada, dermatomizada a uma espessura de 700 µm utilizando dermatômetro e posicionada nas células de Franz com a região da derme voltada para a solução receptora e o EC voltado para o compartimento superior. A integridade da membrana foi determinada pelas medidas da resistência elétrica através da membrana da pele. Posteriormente, as formulações objeto de estudo foram quantitativamente (2,0 mg/cm²) pesadas, evitando-se a formação de bolhas entre a formulação e a pele e procedeu-se com o estudo de penetração cutânea, conforme descrito à seguir.

4.2.5.1.1 Estudo *ex vivo* da penetração cutânea

Foram realizados à temperatura ambiente sob agitação constante de 300 rpm, usando tampão fosfato isotônico pH 7,4 (0,1M) acrescido de 4,0% de soro de albumina bovina como meio receptor (12,0 mL) (SCCS, 2010). O experimento teve duração de 12 horas. Ao final desse período, amostras de 1,2 mL foram coletadas e transferidas para tubos Falcon de 50 mL de capacidade e, em seguida, foram adicionados 4,8 mL de acetonitrila para provocar a precipitação da albumina. Os tubos foram levados à centrifugação por 10 minutos a 985g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e o conteúdo foi seco sob ar comprimido e ressuspendido em 500 µL de uma solução de álcool etílico:DMF (1:1). As soluções concentradas foram filtradas em filtros de 0,45 µm de porosidade e quantificadas por CLAE.

4.2.5.1.2 Estudo *ex vivo* de retenção cutânea por “*tape stripping*”

A técnica de “*tape stripping*” baseia-se na remoção progressiva do estrato córneo (EC) pela aplicação sequencial de fitas adesivas na área onde a formulação foi aplicada, seguida da extração das substâncias ativas retidas nas fitas e posterior determinação por método adequado. Ao final do experimento de penetração (12 horas), o excesso da formulação do protetor solar presente na superfície da membrana foi delicadamente removido com auxílio de água purificada e papel absorvente. Na área exposta à difusão, o EC foi retirado por meio da aplicação sucessiva de 15 fitas adesivas. A quantidade de fitas a ser utilizada na técnica de “*tape stripping*” (15 fitas) foi padronizada com base na total remoção do EC, indicada pelo brilho na face exposta da pele (LOPES *et al.*, 2010).

As fitas foram colocadas em tubos falcon e, a seguir, foram adicionados 5 mL da solução extratora, composta por álcool etílico:DMF (1:1). Os tubos com as fitas imersas na solução extratora foram agitados em vórtex por 3 minutos. Alíquotas de 2,0 mL das soluções foram transferidas para outro tubo falcon e levadas ao ar comprimido até evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspendido em 500µL de solução extratora, filtrado em filtros de 0,45 µm de porosidade e analisado por CLAE.

Após remoção do EC, a área de permeação foi recortada, picotada em fragmentos menores e colocados em tubos falcon, aos quais foram adicionados 5 mL

da mesma solução extratora. Os tubos com os fragmentos de E+D imersos na solução extratora foram agitados em homogeneizador de tecidos por 1 minuto e deixados em banho de ultrassom por 30 minutos para romper as células e extrair as substâncias em estudo. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm (985g). Alíquotas de 2 mL das soluções foram transferidas para outro tubo falcon e levadas ao ar comprimido até evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 500 µL de solução extratora, filtrado em filtros de 0,45 µm de porosidade e analisado por CLAE.

4.2.5.2 Penetração cutânea por Microscopia Confocal Raman

Microscopia Confocal Raman (MCR) foi realizada usando um Analisador da Composição da Pele, ilustrado na Figura 2, comumente empregado para investigações *in vivo* / *in vitro*. Um laser na região próxima ao infravermelho (785 nm, 20 mW na superfície da pele, tempo de exposição de 5 segundos) foi usado para analisar as amostras da pele de orelha de porco na região “*fingerprint*” (400 a 2000 cm⁻¹). Basicamente, um laser na região próxima ao infravermelho (1) é direcionado na amostra da pele (5) pela objetiva do microscópio (3), localizada sob uma janela transparente de CaF₃. A luz dispersa pela pele é coletada pela mesma objetiva e refletida pelos espelhos (4) e pelo filtro de curta passagem (2). A luz refletida é, então, filtrada pelo filtro de rejeição do laser (6) e focado (7) dentro de uma fibra óptica (8) conectada ao espectrômetro (9) e equipado com uma câmara acoplada (10). O espectro obtido na região *fingerprint* é exibido e analisado pelo computador (11) (DARVIN *et al.*, 2013).

Este estudo foi realizado durante o Doutorado Sanduíche, em Berlim (Alemanha). Foi utilizada pele de orelha de porco, entregue de um batedouro local (Berlim, Alemanha) e usada fresca até dois dias depois. Antes dos experimentos, a pele foi limpa em água corrente, seca em papel toalha e mantida sob refrigeração até o momento do ensaio. Os espectros Raman foram então obtidos da superfície da pele até uma profundidade de 40 µm, de 2 em 2 µm, ou seja, foram obtidos apenas à nível da epiderme. Foram obtidos espectros da pele não tratada e da pele tratada com a formulação.

Figura 2: Ilustração do Microscópio Confocal Raman: 1) Fonte do laser (785 nm); 2) Filtro de curta passagem; 3) Objetiva; 4) Espelhos; 5) Amostrador; 6) Filtro de rejeição do laser; 7) Sistema de foco; 8) Fibra óptica; 9) Espectro; 10) Câmara acoplada; 11) Computador.

A formulação objeto de estudo foi aplicada em uma área ($9,0 \text{ cm}^2$) previamente demarcada na superfície da pele à uma concentração de $2,0 \text{ mg cm}^2$, de acordo com o procedimento padrão da COLIPA. E após 1 e 6 horas de penetração em condições ambientais (21°C , 35% UR), o excesso da formulação foi removida da superfície da pele e as medidas por MCR foram realizadas em, pelo menos, 5 diferentes pontos da amostra de pele. No total, 5 diferentes orelhas de porco foram analisadas. As áreas da pele sem pêlos e rugas foram escolhidas para fazer as medidas.

Para determinar a profundidade de penetração média do protetor solar (FFAN) na pele a cada ponto de medida, os espectros da amostra de pele tratada e não-tratada foram comparados aplicando o método do Ajuste Múltiplo de Raiz Quadrada Não-restrito (AMN) usando o *software Skin Tools 2.0* (CHOE *et al.*, 2015). Com este método é possível calcular os coeficientes dependentes da profundidade para cada composto presente no EC, como colesterol, ceramidas, ureia, água e etc, ajustando o espectro Raman da pele pelo seu espectro modelo conhecido, minimizando o erro residual da análise. Para a pele tratada com o protetor solar, os mesmos coeficientes podem ser determinados, além de um coeficiente adicional referente aos ingredientes da formulação. Desta forma, estes coeficientes servem como uma medida da concentração relativa dos ingredientes do protetor solar na pele (CASPES *et al.*, 2001; DARVIN *et al.*, 2013). O método AMN já foi previamente descrito em mais detalhes por ZHU *et al.* (2015) e usado para determinação da profundidade de penetração de substâncias aplicadas topicamente na pele (CHOE *et al.*, 2015).

4.2.6 Avaliação da eficácia *ex vivo* por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

4.2.6.1 Espectroscopia de RPE

Este estudo foi realizado durante o Doutorado Sanduíche, em Berlim (Alemanha). Espectroscopia de RPE é baseada na absorção de micro-ondas de ressonância de uma amostra com par de elétrons não-pareados em um campo magnético externo. Um equipamento de RPE acoplado à um simulador solar, foi usado neste estudo para determinação do potencial antioxidante da formulação fotoprotetora, bem como para a avaliação da formação radicalar em pele de orelha de porco após exposição às radiações UVA/UVB, VIS e IV do espectro solar (MEINKE *et al.*, 2011; MEINKE *et al.*, 2013).

Para determinação do potencial antioxidante, os seguinte parâmetros foram usados: modulação: 2 G, Atenuação de micro-ondas (AM): 15 dB (Poder AM 3,16 mW), ganho: 1, tempo de varredura: 20s, varredura: 95,25 G, campo B_0 : 3371,53 G, passo: 4096 e número de passos: 1. E para determinação da formação radicalar, os seguinte parâmetros foram usados: modulação: 2 G, Atenuação de micro-ondas (AM): 10 dB (Poder AM 10 mW), ganho: 100, tempo de varredura: 20s, varredura: 53,34 G, campo B_0 : 3358,36 G, passo: 4096 e número de passos: 1.

4.2.6.2 Determinação do potencial antioxidante

Para determinação do potencial antioxidante, DPPH (1,1-difenil-2-picrylhidrazil) foi usado como radical teste, que é detectável por RPE e pode ser reduzido pelo sistema antioxidante da formulação estudada. O número de radicais teste reduzidos representa a atividade sequestradora de radicais que é normalizada para 1 mg da substância/produto com atividade antioxidante. O potencial antioxidante foi calculado de acordo com a Eq. 14:

$$\text{Potencial antioxidante} = \frac{CR \times FR}{CP} \quad (\text{Eq. 14})$$

onde, CR é a concentração do radical teste [radical.mL^{-1}]; FR é o fator de redução, que representa a diferença entre a intensidade do radical teste não-tratado e a redução da intensidade do sinal após tratamento com o antioxidante, normalizado ao sinal do radical teste não tratado; CP é a concentração do produto (mg.mL^{-1}); e o potencial antioxidante é expresso como 10^{14} radicais. mg^{-1} (MEINKE *et al.*, 2011; MEINKE *et al.*, 2013).

Para tanto, 40 mg de cada formulação, FFE e FFAN, foi previamente solubilizada em 1,2 mL de álcool etílico (para análises espectrofotométricas), seguida pela diluição (1:1) em solução etanólica de DPPH. AS amostras foram mantidas em agitação constante e as medidas realizadas após 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, até estabilização do sinal do DPPH.

4.2.6.3 Avaliação *ex vivo* da formação radicalar

As formulações FFE e FFAN, foram avaliadas quanto a proteção oferecida à formação de radicais livres, antes e após irradiação nas regiões UVA/UVB, VIS e IV do espectro solar. O “*spin trap*” utilizado foi o nitróxido de PCA, que possui um par de eletrons livre não-pareado, e é detectável por RPE. PCA dificilmente reage com antioxidantes da pele, mas muito bem com radicais livres induzidos, que recombina com o PCA, que torna indetectável por RPE. Desta forma, a formação radicalar é manifestada pela redução do sinal do PCA devido à sua reação com os radicais livres formados na pele após irradiação (HERLLING *et al.*, 2003).

A pele de porco utilizada neste estudo foi entregue de um batedouro local (Berlim, Alemanha) e usada fresca até dois dias depois. Antes dos experimentos, a pele foi limpa em água corrente, seca em papel toalha e mantida sob refrigeração até o momento do ensaio.

Para irradiação *in situ* das amostras, foi usado um simulador solar acoplado às fibras UV/VIS ou VIS/IV (comprimento de onda 190-2200 nm e 400-2200 nm respectivamente) em associação com os seguintes filtros, para limitar as diferentes regiões do espectro: filtro do simulador solar LSZ185 AMO, filtro 400FH90-50S (>400 nm), filtro PGO-57400 (400-700 nm) e filtro 001FG09-50S (325-328 nm). As amostras foram irradiadas por 6 minutos e expostas às radiações UVA/UVB (dose igual à $500 \pm 30 \text{ mJ/cm}^2$ e $2.0 \pm 0.1 \text{ mJ/cm}^2$, respectivamente, medidas usando sensor UVA e UVB),

VIS (dose igual à $10600 \pm 60 \text{ mJ/cm}^2$) e VIS/IV (dose igual à $19064 \pm 60 \text{ mJ/cm}^2$), ambos mensurados com auxílio de sensor da radiação solar (Economic Handheld Optical Power Meter, 843-R).

De acordo com o procedimento padrão da COLIPA, $2,0 \text{ mg/cm}^2$ de cada formulação testada foi aplicada na superfície da pele de orelha de porco e deixada em contato por 1 hora para permitir a penetração da formulação. Posteriormente, a amostra de pele foi embebida em uma solução (1:1) de PCA $100 \mu\text{M}$ em tampão PBS por 5 minutos e os radicais de PCA gerados devido à radiação foram detectado por RPE. Como controle, uma amostra da pele tratada com o protetor solar e não irradiada foi também avaliada, bem como amostras de pele não tratadas e não irradiadas.

Todas as medidas foram realizadas em duplicata, em áreas adjacentes da amostra da pele e repetidas em 5 diferentes amostras de pele de orelha de porco. Os dados finais foram normalizados com as primeiras medidas e ajustados para o tempo zero. Para determinar a formação radicalar devido à irradiação em determinada região do espectro solar antes e após aplicação da formulação, os valores médios foram calculados e os dados da amostra irradiada foram subtraídos dos dados da amostra não irradiada. A formação radicalar na região IV foi determinada subtraindo a formação radicalar no VIS pela formação radicalar na região do VIS/IV.

4.2.7 Avaliação do FPS e da proteção UVA *in vitro*

A avaliação do FPS e da proteção UVA *in vitro* foi conduzida pela ChemyUnion Química Ltda (Sorocaba, SP) para as formulações FFE e FFAN. Para tanto, foi empregada a técnica de espectrofotometria de transmitância difusa, usando o equipamento Labsphere® (UV1000-S, EUA), que mede a absorção difusa da amostra na região UV (de 250 nm a 450 nm). Uma placa de PMMA (polimetilmetacrilato) foi utilizada como substrato para a avaliação da eficácia *in vitro*, cuja rugosidade se aproxima da pele humana e vem sendo amplamente utilizada para análises de fotoproteção *in vitro* (DIFFEY *et al.*, 2000). As amostras do protetor solar foram aplicadas sobre a placa de PMMA ($1,3 \text{ mg/cm}^2$), de modo a garantir uma distribuição homogênea. O substrato permaneceu em repouso por 30 minutos (protegido da luz) antes das leituras serem realizadas, em 6 pontos diferentes da placa de PMMA.

O valor do FPS *in vitro* foi calculado pelo software integrado ao equipamento, que consiste em avaliar a transmitância do substrato (PMMA) com e sem produto. As leituras foram realizadas em 6 pontos de cada substrato em triplicata. Já a proteção UVA, também foi calculada pelo *software* integrado ao equipamento, sendo avaliada através do percentual de absorção, da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico (λ_c). O nível de proteção UVA do produto foi classificado de acordo com a metodologia *Boot's Star Rating*. Os cálculos para a razão UVA/UVB e λ_c são independentes da absorbância obtida no intervalo de leitura espectral, sendo assim independentes da concentração do produto no substrato e, consequentemente, da lei de Lambert-Beer. Portanto, foi preciso associar os dados da razão UVA/UVB e do λ_c com a absorção média a fim de se ter uma interpretação consistente (DIFFEY *et al.*, 2000).

4.2.8 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos para avaliação da estabilidade das NLS, comportamento reológico das formulações e estudo de penetração por MCR, foram submetidos ao teste paramétrico de análise de variância, seguido pelo teste complementar de Turkey ($p < 0,05$). Os dados experimentais obtidos para a formação radicalar cumulativa, antes e após radiação, nas diferentes regiões do espectro solar, foram analisadas pelo teste de Wilcoxon para amostras dependentes ($p < 0,05$). Todos os testes acima referidos foram realizados usando o *GraphPad Prism* v.7.

5. Casuística e Métodos

5.1 Determinação do FPS *in vivo*

Segundo a RDC nº 30/21012 (BRASIL, 2012b) a determinação do FPS de um produto cosmético deve ser determinada *in vivo* e segundo metodologia padronizada e validada internacionalmente (FDA ou COLIPA). Sendo assim, o FPS *in vivo* foi determinado de acordo com o método COLIPA (COLIPA, 2006), realizado pela empresa Allergisa Eficácia (Campinas, SP) para as formulações FFE e FFAN, contendo ou não DMC-NLS e a microalga *Spirulina*.

O estudo foi realizado segundo protocolo de estudo padronizado pela referida empresa, mono-cego, aleatório, com controle paralelo do fator de proteção solar de um produto de uso tópico, utilizando 10 voluntários. Os critérios específicos de inclusão foram: voluntários de ambos os gêneros, pele fototipo I, II e III (escala Fitzpatrick), idade entre 18 a 60 anos. E critérios de exclusão: histórico de reações fototóxicas ou fotoalérgicas, histórico pessoal ou familiar de câncer de pele, presença de queimadura solar, bronzamento realizado nas últimas duas semanas anteriores ao estudo, ocorrência de hiperpigmentações e hipopigmentações na área estudada, nevos, queratose seborréica ou excesso de pelos na face.

Como fonte da radiação UVB foi utilizado o simulador solar Multiport 601 com lâmpada de arco de xenônio, filtros Schott WG320 e UG11, com seis saídas independentes. A dose de radiação foi ajustada por um detector ultravioleta de eritema-efetivo PMA 2103LLG. A formulação P2 COLIPA contendo 7,0% de *ethylhexyl dimethyl PABA* e 3,0% de *oxybenzone*, com FPS esperado na faixa de 14,2 a 19,0, foi utilizada como controle (COLIPA, 2006).

As amostras e formulação controle foram aplicadas na região dorsal dos voluntários (região dorsal infra-escapular), em regiões diferentes (área de 30 cm²) e na concentração de 2,0 mg/cm² cada. Após 15 a 30 minutos, as áreas foram irradiadas. A formação do eritema foi avaliada após 16 a 24 horas após a irradiação. A dose eritematogênica mínima (MED) é a menor dose de radiação UVB capaz de gerar os primeiros sinais de eritema perceptível com bordas bem definidas. O FPS individual (FPS_i) das amostras e formulação controle, para cada voluntário, foi calculado conforme Eq. 15:

$$FPS_i = \frac{MED_{pele\ protegida}}{MED_{pele\ protegida}} \quad (\text{Eq. 15})$$

onde, FPS_i é o Fator de Proteção solar individual; MED é a dose eritematogênica mínima (MED) da pele protegida e não protegida. O FPS final das amostras e controle foram calculados pela média do FPS_i e o desvio padrão. Foi utilizado o teste *t-Student* como tratamento estatístico em intervalo de confiança de 95%.

5.2 Avaliação da eficácia clínica *in vivo*

Os estudos de eficácia clínica das formulações fotoprotetoras desenvolvidas neste estudo foram realizados após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Protocolo CEP-FCFRP nº. 315 - ANEXO I). As voluntárias foram esclarecidas e orientadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa e, concordando em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (BRASIL, 2012a). Foram selecionadas 44 voluntárias saudáveis, do sexo feminino, com peles fototipo II, III ou IV (PATHAK *et al.*, 1993), com idade entre 30-50 anos. Todos os estudos de eficácia foram realizados sob a supervisão do médico dermatologista, Dr. João Carlos Lopes Simão (CRM: 94214), durante os meses de Outubro/2014-Janeiro/2015.

Os critérios de exclusão para este estudo foram: indivíduos do sexo masculino; fumantes; gravidez ou aleitamento; menopausa; mulheres com história anterior de reações adversas com o uso de produtos cosméticos; indivíduos em uso de medicamentos passíveis de produzir resposta cutânea anormal; doenças dermatológicas localizadas ou generalizadas; mulheres que realizaram procedimentos cosmiátricos, peeling, dermoabrasão eletrocoagulação, laser, cirurgia ou escleroterapia nos últimos 6 meses, na região de estudo; mulheres que se expõem ao sol durante os dias que antecederam o estudo e/ou ter um bronzeado persistente; mulheres com lesões, cicatrizes, tatuagens e/ou excesso de pelos na região de estudo; mulheres que não residiam em Ribeirão Preto.

As voluntárias selecionadas para o estudo foram divididas em dois grupos: um grupo controle (22 voluntárias), que recebeu a formulação fotoprotetora FFE (sem adição da microalga *Spirulina* e NLS-DMC); e outro grupo (22 voluntárias) que recebeu a formulação fotoprotetora FFAN (com adição da microalga *Spirulina* e NLS-DMC). As voluntárias não sabiam a que grupo pertenciam e foram orientadas a

não utilizar nenhum outro produto cosmético 28 dias antes e durante o período do estudo (exceto protetor solar), e a aplicar o produto na face, todos os dias, no mínimo, duas vezes por dia (manhã e tarde). As voluntárias receberam formulações recém-preparadas a cada 28-30 dias.

Foram efetuadas medidas no tempo inicial (T0) para a obtenção dos valores basais, e após 28, 56 e 84 dias de aplicação das formulações. Antes de efetuar cada medida, as voluntárias foram aclimatadas por 30 minutos em ambiente com temperatura ($21,0 \pm 1,0$ °C) e umidade relativa do ar (45% a 55%) controlados. As medidas foram realizadas nas regiões frontal e periorbital da face de cada voluntária. O lado da região periobital ao qual foram efetuadas as medidas foi realizado de forma randomizada. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante o estudo de eficácia clínica: conteúdo aquoso do EC, perda transepidérmica de água, propriedades mecânicas da pele e espessura e ecogenicidade da derme.

5.2.1 Determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo

O conteúdo de água do EC foi determinado utilizando o equipamento Corneometer®. O princípio do método está baseado na diferença entre a constante dielétrica da água (81) e de outras substâncias (normalmente < 7) através da medição da capacitância do meio dielétrico. Qualquer mudança na constante dielétrica, referente à variação na hidratação da superfície da pele, conduz a um cálculo de capacitância diferenciado pelo capacitor, logo, quanto maior for o teor de água no estrato córneo, maior será a capacitância da pele. O aparelho consiste em uma sonda composta por dois eletrodos com diferentes cargas elétricas que, quando aplicada sobre a pele, emite um campo elétrico que atinge o EC e promove mudanças na capacitância do mesmo. Essa mudança é detectada por um condensador de precisão que se encontra no interior da sonda, conforme o conteúdo de água da pele. A profundidade da medição é baixa (os primeiros 10-20 μM do estrato córneo) (DAL'BELLO *et al.*, 2006; CLARYS *et al.*, 2012).

O resultado é mostrado no monitor do PC e cada medida leva apenas um segundo. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (u.a.) onde se estima que 1 UA equivale a 0,2 - 0,9 mg de água por grama de estrato córneo. Neste

estudo, foram efetuadas 5 medições em cada região de estudo, na face das voluntárias, e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5.2.2 Determinação da perda transepidérmica de água

A perda transepidérmica de água (TEWL) foi determinada usando o equipamento Tewameter® e representa a perda total de água da epiderme viável e derme por difusão através do estrato córneo para a superfície, originada das glândulas sudoríparas. O sistema consiste de um *probe* em forma de cilindro, aberto nas partes superior e inferior, que mede a taxa de evaporação da água da epiderme quando colocado em contato com a pele, com base no princípio da Lei de Difusão de Fick, Eq. 16 (MACHADO *et al.*, 2010; SOTOODIAN & MAIBACH, 2012):

$$\frac{dm}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx} \quad (\text{Eq. 16})$$

onde, A é a área da superfície (m²), m é a quantidade de água transportada (g), t é o tempo (horas), D é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar (0,0877 g/m.h.mm Hg) e p é a pressão entre a superfície da pele e o ponto de medição. O fluxo de difusão “dm/dt” indica a massa por cm² que está sendo transportada durante certo período de tempo. Este é proporcional à área “A” e à variação da concentração em função da distância “dp/dx”.

O gradiente de densidade de vapor é medido indiretamente através de dois pares de sensores (temperatura e umidade relativa), e os dados resultantes são analisados por um microprocessador. Os valores das medições são dados em g/m² h. A versão padrão do instrumento apresenta os seguintes parâmetros experimentais: TEWL (0-90 g/m²h), umidade relativa (0-100%) e temperatura (0-50°C) ao nível dos sensores (ELKEEB *et. al.*, 2010). Neste estudo, foram efetuadas 3 medições em cada região de estudo, na face das voluntárias, e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5.2.3 Determinação da espessura e ecogenicidade da derme

Para determinação da espessura e ecogenicidade da derme, foi utilizado o equipamento DermaScan®, equipado com uma unidade de ultrassom de alta frequência de 20 MHz que permite a obtenção de imagens bidimensionais transversais da pele até a profundidade de 1,5 cm, com resolução de 60 x 200 um (axial x lateral). O dispositivo consiste de um transdutor, um sistema de elaboração, e um sistema de armazenamento de dados. A onda ultrassônica (velocidade de 1580/s) é parcialmente refletida nas estruturas da pele e gera ecos de diferentes amplitudes. A intensidade dos ecos refletidos (ecogenicidade) é avaliada por um microprocessador e visualizada como uma imagem colorida de duas dimensões. A escala de cores da ecogenicidade vai do branco > vermelho > amarelo verde > azul ao preto, sendo o branco a cor mais ecogênica e o preto menos ecogênico. Em uma imagem cutânea normal, a epiderme aparece como uma banda branca, a derme é expressa como uma composição de duas cores, amarelo e vermelho, e a camada subcutânea aparece em preto (GNIADÉCKA *et al.*, 1994; UNHOLZER & KORTING, 2002; CRISAN *et al.*, 2015).

Para calcular a ecogenicidade, o número total de pixels é medido pelo *software* Dermavision de análise de imagem (Cortex Technology, Dinamarca) e relacionado com o número de pixels de alta ecogenicidade. A amplitude dos pixels são, então, convertidos em uma escala numérica que varia de 0 a 255. Nesta escala, a área dos pixels de baixa ecogenicidade corresponde ao intervalo de 0-50, a área de pixels de média ecogenicidade corresponde a 50-150, e os pixels de alta ecogenicidade no intervalo de 200-255 (CRISAN *et al.*, 2015; CAETANO *et al.*, 2016).

Neste estudo, foram capturadas 3 imagens na face de cada voluntárias e, após tratamento da imagem usando o *software* Dermavision (modo B-scan), foram calculados a espessura da derme (mm), o número de pixels de baixa ecogenicidade (PBE), o número de pixels de alta ecogenicidade (PAE) e a relação de ecogenicidade (PAE/PT), sendo PT o número de pixels totais. Para cálculo da espessura da derme, foi selecionada a região entre a parte inferior da epiderme e a interface da derme com a hipoderme. A distância média entre estas duas linhas representa a espessura média da derme (CAETANO *et al.*, 2016; MERCURIO *et al.*, 2016). Cada parâmetro é expresso como média $\pm$ desvio padrão.

5.2.4 Determinação das propriedades mecânicas da pele

A elasticidade e firmeza da pele foram determinadas usando o dispositivo Cutometer[®], equipado com uma sonda que possui um orifício com 2 mm de diâmetro, e que mede, de forma não invasiva, a deformação da pele em resposta à sucção. Uma pressão negativa é criada pelo dispositivo de leitura e a pele é arrastada para a abertura da sonda e, após um tempo definido, a pele é novamente liberada, voltando ao estado inicial. Dentro da sonda, a profundidade de penetração é determinada por um sistema de medição óptico, constituído por uma fonte e um receptor de luz, bem como dois prismas voltados um para o outro, que projetam a luz do transmissor para receptor. A intensidade da luz varia de acordo com a profundidade de penetração da pele e o *software* acoplado fornece resultados quantitativos de acordo com o perfil de distensão e retorno da pele, fornecendo diferentes parâmetros relacionados com a viscoelasticidade e firmeza da pele (PIERARD, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2001; LUEBBERDING *et al.*, 2014).

A resistência da pele à pressão negativa (firmeza) e a sua capacidade para voltar a sua posição original (elasticidade) são registrados, em tempo real pelo *software*, em função da deformação da pele (milímetros) com o tempo (segundos), conforme demonstrado na Figura 3. Os parâmetros fornecidos através da curva obtida são: R0 (Uf), distensão da pele; R1(R), deformação residual da pele; R2 (Ua/Uf), elasticidade bruta da pele, incluindo deformação viscosa; R3, última amplitude máxima; R4, última amplitude mínima; R5 (Ur/Ue), elasticidade líquida da pele, sem considerar a deformação viscosa; R6, (Uv/Ue), viscoelasticidade da pele; R7 (Ur/Uf), elasticidade biológica, que é a habilidade da pele em retornar à sua posição inicial, após uma deformação e R8, área acima da curva, dada por Uf e pelo tempo de sucção (RODRIGUES *et al.*, 2001; LUEBBERDING *et al.*, 2014).

Figura 3: Curva de deformação da pele obtida pelo equipamento Cutometer®.

Legenda: Ue: distensão imediata, Uv: distensão retardada, Ua: retração total, Ur: retração imediata, Uf: distensão final, R: deformação residual no fim do ciclo de medida.

Neste estudo, foram efetuadas 3 medições em cada região de estudo, na face das voluntárias, com as seguintes especificações: tempo de sucção: 1 s; tempo de interrupção da sucção: 1 s; pressão: 450 mbar; n° de ciclos: 3 ciclos consecutivos; tempo total: 6 s. Os parâmetros R2, R5, R6 e R7 foram calculados e expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5.3 Avaliação sensorial da formulação fotoprotetora

Ao final do estudo de eficácia clínica, as voluntárias receberam um questionário para avaliar o sensorial das formulações, bem como a intenção de compra do produto. O questionário utilizado foi o “*check-all-that-apply*” (CATA) com atributos relacionados às características sensoriais da formulação, como: oleosa, pegajosa, suave, facilmente absorvida e fácil de espalhar; e aos efeitos na pele após aplicação da formulação, como: resíduo oleoso, pele hidratada, pele macia, resíduo esbranquiçado, redução da hiperpigmentação, redução do número de rugas, melhora da firmeza da pele, irritação e intenção de compra (PARENTE *et al.*, 2011; PENSÉ-LHÉRITIER, 2015). Os resultados foram expressos como a porcentagem de voluntárias que assinalou cada uma das características citadas anteriormente.

5.4 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos na avaliação sensorial e de eficácia clínica das formulações foram submetidas à análise de normalidade da distribuição amostral, através do teste de correlação de Person ($\alpha < 0,05$). Para dados em que foi verificada a distribuição normal, foi realizado o teste *t de Student* ($p < 0,05$) para amostras pareadas, para a avaliação dos efeitos da formulação com o tempo. E a avaliação dos valores basais (T0) entre os dois grupos estudados foi realizada com o teste *t de Student* ($p < 0,05$) para amostras não pareadas.

Para as análises em que foi verificada distribuição não normal, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparação dos valores basais (T0) entre os dois grupos estudados. Para a avaliação dos efeitos da formulação com o tempo, foi realizado o *teste de Wilcoxon* ($p < 0,05$). Todos os testes acima referidos foram realizados usando o GraphPad Prism v.7.

6. Resultados e Discussão

6.1 Desenvolvimento da formulação fotoprotetora

Neste estudo, foram desenvolvidas formulações gel-creme, conforme indicado na Tabela 4. A escolha das matérias-primas utilizadas foi baseada no fato de que, o ponto crítico na etapa de desenvolvimento, do ponto de vista técnico, para garantir a obtenção de um bom produto fotoprotetor, é a escolha dos filtros solares, dos emolientes e dos emulsificantes utilizados (KHURY & BORGES, 2013). Portanto, a base autoemulsionante *cetearyl alcohol, dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate* foi utilizada, por ser compatível com as demais matérias-primas e conferir excelente estabilidade às emulsões, além de proporcionar maior resistência à água em protetores solares (Croda, Informativo técnico). E o *acrylates/c10-30 alkyl acrylate crosspolymer* foi usado como agente de consistência; é um emulsificante polimérico, que tem sido utilizado no desenvolvimento de fotoprotetores, conferindo vantagens adicionais para a formulação do ponto de vista sensorial, tornando-as menos untuosas ao toque (FERRARI & ROCHA-FILHO, 2011). Além disso, pode influenciar na espalhabilidade do produto, pois também atua como regulador da evaporação da água da formulação e, em alguns casos, pode reduzir a penetração cutânea de alguns componentes prevendo o potencial irritante do produto (KHURY & BORGES, 2013). Neste estudo, foram escolhidos o *C12-15 alkyl benzoate*, o *caprylic/ capric triglyceride* e o *cyclometicone* como emolientes, com alto poder solubilizante.

Como filtros solares, inicialmente, optou-se pela associação dos seguintes filtros: *bis-ethylhexymethoxyphenyl triazine* (BEMT), *diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate* (DHHB), *ethylhexyl triazone* (EHT) e *phenylbenzimidazole sulfonic acid* (AFS), com um valor de FPS estimado de 30, segundo simulador online da Basf, *Sunscreen Simulator* (HERZOG & OSTERWALDER, 2011). No entanto, quando avaliada a estabilidade das formulações contendo o filtro AFS e o ativo DMC, foi observada instabilidade da formulação, uma vez que o ativo DMC não é estável em pH superior à 6,0. Como o pH de estabilidade do filtro AFS é na faixa de 7,2-7,5, optou-se por usar o *methylenebis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol* (MBBT) como substituto, mantendo o mesmo FPS estimado de 30 e pH final de 5,0.

Como antioxidantes, foram selecionados a microalga *Spirulina* e o DMC. O extrato seco de *Spirulina* foi incorporado nas formulações na concentração de 0,1% (p/p) após adequada solubilização em propilenoglicol. Este extrato contém entre 50-

70% de seu peso seco em proteínas. Sua composição de aminoácidos inclui: glicina, lisina e ácido gama-linolênico; e possui 8-14% de polissacarídeos, entre eles: glicose, galactose, manose e ribose e, ainda, aproximadamente, 6% de conteúdo lipídico. O extrato seco ainda é rico em pigmentos, entre eles β -caroteno (pro-vitamina A) e Vitamina B (MAIA CAMPOS *et al.*, 2014). MAIA CAMPOS *et al.* (2014) e DELSIN *et al.* (2015) demonstraram que a *Spirulina* possui excelente atividade antioxidante, além de atuar na hidratação, na melhoria da função barreira da pele e do microrrelevo da pele. Já o DMC é um análogo sintético do gama-tocoferol e que tem demonstrado potente atividade antioxidante em testes *in vitro*, sendo capaz de eliminar os radicais livres através de um duplo mecanismo de ação. O DMC é capaz de combater tanto as espécies reativas ao oxigênio (ERO's) quanto as espécies reativas ao nitrogênio (ERN's), sendo, portanto, um grande diferencial frente aos outros antioxidantes conhecidos, que são capazes de combater apenas uma dessas espécies (Lipotec Ltda).

O veículo e demais componentes adicionados às formulações fotoprotetoras podem interferir com o FPS e podem interagir com o filtro solar, alterando a estabilidade da formulação e a eficácia da mesma (MILESI & GUTERRES, 2002). Portanto, a formulação final foi definida após preparo de diferentes formulações, onde se procurou identificar qual dentre elas apresentavam melhores características físico-químicas, a fim de que pudesse ser alcançada uma maior estabilidade, eficácia e melhor aspecto na formulação final. Dentre as formulações preparadas, FFE, FFA e FVE, foram selecionadas para dar continuidade aos estudos propostos.

6.2 Desenvolvimento, caracterização e estabilidade das NLS

6.2.1 Desenvolvimento e caracterização das NLS

Para o desenvolvimento das NLS, contendo ou não o ativo DMC, foram avaliadas as ceras naturais de abelha e carnaúba como carreadores lipídicos. O uso de fontes vegetais renováveis para obter nanocarreadores lipídicos tem sido bastante empregado e apresenta potencial para satisfazer as necessidades da indústria e dos consumidores, devido a sua segurança e sustentabilidade (ZHANG & SMITH, 2011; LACATUSU *et al.*, 2014). Neste estudo foi usado o método de

microemulsão à quente, que destaca-se, entre os diversos métodos descritos na literatura para produção de sistemas nanoestruturados, pois além de dispensar a utilização de solventes orgânicos, é um processo simples e barato. Além disso, microemulsões são sistemas heterogêneos termodinamicamente estáveis, formados espontaneamente devido à tensão interfacial reduzida entre uma fase interna e uma fase externa (SOUTO, *et al.*, 2011; ZAMARIOLI *et al.*, 2015).

O tamanho de partícula e IPd obtidos para os sistemas inicialmente desenvolvidos neste estudo, à partir das ceras de abelha e carnaúba, estão apresentados na Tabela 8. Em função deste resultado preliminar, os sistemas constituídos apenas pela cera de abelha, F1 e F2, foram selecionados para dar continuidade aos estudos, uma vez que apresentaram menor tamanho de partícula.

Tabela 8: Tamanho de partícula e IPd (média $\pm$ DP) para as NLS desenvolvidas à partir das ceras de abelha e de carnaúba, após 24 horas de preparo (n=3).

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	IPd	Potencial zeta	pH
F1	98,0 $\pm$ 12,63	0,293 $\pm$ 0,022	-9,26 $\pm$ 0,53	3,95 $\pm$ 0,07
F2	120,6 $\pm$ 24,24	0,384 $\pm$ 0,027	-10,5 $\pm$ 0,88	4,05 $\pm$ 0,02
F3	395,3 $\pm$ 23,26	0,442 $\pm$ 0,036	-	-
F4	494,0 $\pm$ 48,39	0,594 $\pm$ 0,048	-	-

Legenda: F1: NLS de cera de abelha; F2: NLS de cera de abelha contendo o DMC (0,5% p/v); F3: NLS de cera de abelha e cera de carnaúba; F4: NLS de cera de abelha e cera de carnaúba. contendo o DMC (0,5% p/v).

De acordo com o MALVERN ZETASIZER (2009), altos valores de IPd podem interferir com a veracidade dos valores obtidos para o tamanho de partícula. O *software* do Malvern Zetasize aplica um método de análise cumulativa para calcular o tamanho médio de partícula e polidispersidade. Mas quando os valores do IPd estão acima de 0,25, essa análise cumulativa não é aplicada e, portanto, os valores do tamanho médio e IPd fornecidos não são confiáveis. Baseado nisto, é aconselhável extrair os diâmetros diretamente da frequência de distribuição de tamanho, ou seja, do valor central do pico de maior intensidade (MALVERN ZETASIZE, 2009). Como os valores de IPd encontrados neste estudo foram calculados pelo *software* do Malvern Zetasize usando a análise cumulativa, este valor pode ser usado apenas para análise qualitativa dos resultados (MALVERN ZETASIZE, 2009) e não para comparação quantitativa. Portanto, os tamanhos de

partícula de todos os sistemas apresentados foram calculados diretamente da frequência de distribuição de tamanho (ZAMARIOLI *et al.*, 2015).

A Figura 4 ilustra dois exemplos de distribuição de tamanho obtidos, respectivamente, para F1 e F2 por espalhamento dinâmico de luz após 24 horas de preparo. Como mostrado na Figura 4A, para F1 foi observado apenas um pico com distribuição razoavelmente estreito e tamanho de partícula entre 60 a 300 nm após 24 horas de preparo. Após incorporação do DMC, o perfil da distribuição de tamanho mudou consideravelmente, como pode ser visto na Figura 4B. Neste caso, foi observado distribuição bimodal com tamanho de partícula variando entre 10 a 700 nm. Uma vez que nossa análises devem ser feitas baseadas na intensidade de distribuição, apenas o pico de maior intensidade foi levado em consideração para determinar o tamanho médio das partículas (ZAMARIOLI *et al.*, 2015).

Figura 4: Distribuição do tamanho de partícula para A) F1 e B) F2 determinados por espalhamento dinâmico de luz após 24 horas de preparo.

A Figura 5 apresenta a morfologia e conformação obtidas para F1 e F2 determinados por MFA após 24 horas de preparo. As partículas obtidas se apresentaram esféricas e homogêneas, com tamanho de partícula igual a $92,0 \pm 18,30$ nm e $112,5 \pm 35,8$ nm, para F1 e F2, respectivamente. Estes resultados estão

de acordo com os tamanhos de partícula determinados por espalhamento dinâmico de luz usando Zetasizer, corroborando com o uso da distribuição de frequência para obtenção dos tamanhos médios de partícula.

Figura 5: Microscopia de força atômica: A) visão topográfica - F2 e visão frontal para B) F1 e C) F2, após 24 horas de preparo.

O tamanho ideal para as nanopartículas é bastante controverso e depende da via de administração (MEHNERT & MADER, 2001; MULLER *et al.*, 2002; VAGASYIA *et al.*, 2013). Em geral, nanopartículas para administração sistêmica visando aplicação terapêutica, por exemplo, devem apresentar tamanho de partícula entre 2 e 200 nm, enquanto partículas contendo doxorrubicina com tamanho de partícula entre 175-278 nm foram consideradas satisfatórias para tratamento tópico de câncer (TAVEIRA, 2009; JO *et al.*, 2015). Por outro lado, VAGASYIA *et al.* (2013) consideram que nanopartículas lipídicas sólidas podem apresentar tamanhos entre 50 nm e 1000 nm, e consideraram ótimas as partículas contendo cloridrato de terbinafina com diâmetro de 300 nm. Portanto, as NLS desenvolvidas a partir da cera de abelha foram consideradas satisfatórias para o objetivo proposto neste estudo.

Neste estudo, uma combinação de poloxamer 407 e Tween 80 foram utilizados para obtenção de um adequado tamanho de partícula. De acordo com a literatura, o valor de HBL necessário para emulsificar a cera de abelha em fase aquosa é de aproximadamente 9. Como o Tween 80 tem EHL de 15, foi utilizado uma mistura de Tween e Poloxamer 400 para obter o valor necessário de EHL para estabilizar o sistema (ATTAMA *et al.*, 2008). Tween 80 promove uma estabilização estérica ao sistema devido a interação com os grupos hidrofílicos e a água, criando uma barreira de proteção entre as partículas que previne a coagulação e instabilidade do sistema (MEHNERT & MADER, 2001).

O potencial zeta é um indicativo do potencial de superfície das partículas e valores entre -15 e -30 mV são comuns para estabilizar sistemas nanoparticulados. A maioria das partículas em suspensão possuem carga de superfície, em função da ionização de grupos funcionais, ou até mesmo, pela adsorção de íons na sua superfície. A medida do potencial zeta é realizada através da aplicação de um campo elétrico sobre a dispersão coloidal. Desta forma, as partículas migram em direção ao eletrodo de carga oposta em uma velocidade constante (mobilidade eletroforética). O potencial zeta é calculado através da mobilidade eletroforética das partículas, usando a equação de Henry. Altos valores em módulo indicam que a repulsão eletrostática entre as partículas irá prevenir a agregação e estabilizar a dispersão de NLS (MEHNERT & MADER, 2001; ATTAMA *et al.*, 2008; TAVEIRA, 2009). Os valores de potencial zeta encontrados para os sistemas F1 e F2 não promoveram um forte campo elétrico entre as partículas, mas também não foi um fator crítico para a aglomeração das partículas. Além disso, o potencial zeta não representa apenas a carga de superfície das partículas individuais, mas também a sua carga em relação à dupla camada elétrica resultante de íons circundantes da fase contínua (MALVERN ZETASIZE, 2009). Grupos acídicos dissociados na superfície da nanopartícula podem manter uma carga negativa na superfície da nanopartícula e, além disso a estrutura não iônica do Tween 80 e o valor de pH ácido da dispersão (pH 3-4), também pode ter contribuído para gerar partículas negativamente carregadas.

6.2.2 Estudo preliminar da estabilidade física das NLS

Três lotes de cada formulação de NLS selecionadas (F1 e F2), foram preparados e avaliados quanto a estabilidade física, conforme descrito no item 4.2.1.2. Os valores para tamanho de partícula, IPd, potencial zeta e pH obtidos após 24 horas de preparo foram, respectivamente: $95,72 \pm 9,63$ nm, $0,393 \pm 0,032$, $-9,85 \pm 0,57$ mV e $3,76 \pm 0,03$, para F1; e $120,5 \pm 20,4$, $0,449 \pm 0,012$, $-10,4 \pm 0,5$ mV e $3,95 \pm 0,02$ para F2. Os valores para estes parâmetros obtidos após 54 dias de armazenamento para cada sistema estão indicados nas Tabelas 9-10. Com relação à eficiência de encapsulação, foi obtido $96,02 \pm 0,81$ % de DMC encapsulado nas NLS após 24 hr de preparo. A alta lipofilicidade e grande afinidade entre o DMC e a cera de abelha podem ter resultado na alta eficiência de encapsulação.

Tabela 9: Valores médios dos parâmetros avaliados durante teste preliminar de estabilidade para F1 após 54 dias de preparo e em diferentes condições de armazenamento (n=3).

Temperatura	Tamanho de partícula (nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)	pH
4 °C	$103,36 \pm 30,30$	$0,462 \pm 0,020$	$-10,7 \pm 0,88$	$4,33 \pm 0,14$
25 °C	$124,97 \pm 26,30$	$0,484 \pm 0,047$	$-8,3 \pm 0,53$	$3,93 \pm 0,23$
37 °C	$219,80 \pm 32,29$	$0,549 \pm 0,029$	$-10,5 \pm 0,91$	$3,93 \pm 0,13$
45 °C	$269,80 \pm 55,02$	$0,584 \pm 0,031$	$-10,4 \pm 0,43$	$4,11 \pm 0,21$

Tabela 10: Valores médios dos parâmetros avaliados durante teste preliminar de estabilidade para F2 após 54 dias de preparo e em diferentes condições de armazenamento (n=3).

Temperatura	Tamanho de partícula (nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)	pH
4 °C	$133,69 \pm 23,03$	$0,411 \pm 0,032$	$-10,8 \pm 0,65$	$3,89 \pm 0,21$
25 °C	$183,07 \pm 26,87$	$0,501 \pm 0,029$	$-10,2 \pm 0,37$	$4,11 \pm 0,38$
37 °C	$242,12 \pm 54,67$	$0,526 \pm 0,033$	$-10,7 \pm 0,32$	$4,25 \pm 0,18$
45 °C	$312,04 \pm 46,07$	$0,544 \pm 0,041$	$-10,6 \pm 0,89$	$4,18 \pm 0,12$

Como pode ser verificado, não houve alteração significativa nos parâmetros avaliados após 54 dias à 4,0 °C, sugerindo que os sistemas foram estáveis a esta temperatura. Mas um aumento significativo no tamanho de partícula foi observado para F1 e F2 armazenadas à temperatura ambiente e à 37 °C e 45 °C, devido à agregação entre as partículas. No entanto, visando uma aplicação tópica, estes sistemas devem ser incorporados em uma formulação semissólida para que apresente uma consistência adequada. Desta forma, a estabilidade da partícula deve ser garantida, pelo menos, até o momento de serem incorporadas na formulação semissólida, uma vez que assim que elas são incorporadas nessas formulações, elas são fisicamente estabilizadas pela rede tridimensional presente nestas formulações. Nestas condições, o contato entre as partículas diminui, e a agregação entre elas é evitada (JENNING *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2005; RAZA *et al.*, 2013).

Com relação à eficiência de encapsulação, foi obtido $95,0 \pm 3,72$ % de DMC encapsulado nas NLS após 30 dias de preparo. Lembrando que as nanopartículas foram armazenadas à $4,0 \pm 2,0$ °C durante este período, corroborando com os resultados obtidos para o tamanho de partícula e sugerindo a estabilidade de F2 à esta temperatura. É relatado que a cera de abelha apresenta uma conformação ortorrômbica e baixa taxa de polimorfismo, formando uma estrutura cristalina mais ordenada, o que poderia conduzir a expulsão do fármaco com o tempo (ZHANG & SMITH, 2010). No entanto, não houve alteração significativa da EE (%) do DMC-NLS após 30 dias de armazenamento.

6.3 Estudos preliminares de estabilidade da formulação fotoprotetora

A estabilidade de uma formulação cosmética garante ao consumidor, a qualidade e segurança do produto final. Os aspectos de homogeneidade e brilho, bem como variações no pH, estão entre os parâmetros avaliados na estabilidade. Qualquer componente presente na fórmula, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de uma formulação cosmética. Portanto variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar a estabilidade do produto final e devem, portanto, ser avaliados (BRASIL, 2004; DIAVÃO & GABRIEL, 2009).

Não foi observado alteração na cor, odor e aspecto das formulações (características organolépticas), após 60 dias de preparo, em todas as condições de armazenamento. Os valores de pH obtidos, estão representados na Figura 6, e foram obtidos valores entre 5,3-5,8 para todas as formulações, compatível com o pH da pele, que é levemente ácido (4,6-5,8) (GIANETI *et al.*, 2012).

Figura 6: Valores de pH (média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN durante 60 dias de armazenamento em diferentes condições ambientais (n=3).

O teste de centrifuga também pode ser realizado a fim de se verificar a separação de fases da formulação. A força da gravidade atua sobre o produto, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. Assim sendo, a centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases ou coalescência, entre outras (BRASIL, 2004). Neste teste, também não foi observado separação de fases nas formulações avaliadas após 60 dias de armazenamento, em todas as condições avaliadas.

Logo, podemos concluir que todas as formulações avaliadas neste estudo, FVE, FVN, FFE e FFAN, se mantiveram estáveis após 60 dias de preparo, em todas as condições de armazenamento. Ainda, nenhum dos ativos, DMC-NLS e *Spirulina*, provocaram instabilidade após incorporação nas formulações estudadas.

6.4 Avaliação do comportamento reológico

O comportamento reológico de formulações fotoprotetoras desempenha um papel fundamental na avaliação da eficiência total e qualidade desses produtos. Especialmente com relação a aplicação e desempenho na pele, as medidas de viscosidade e área de histerese fornecem informações importantes sobre consistência, espalhabilidade, propriedades sensoriais e aderência na pele. Também permitem monitorar alterações durante armazenamento e fornecem informações valiosas sobre a microestrutura do sistema (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; KIM *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012).

Os reogramas obtidos para as formulações objeto de estudo estão representados na Figura 7. Por meio da análise dos reogramas, foi possível verificar que as curvas de fluxo de todas as formulações apresentaram comportamento não-newtoniano e pseudoplástico, uma vez que a taxa de cisalhamento não foi diretamente proporcional à tensão de cisalhamento, o que significa que a viscosidade aparente diminui com o aumento da tensão de cisalhamento.

Figura 7: Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN, avaliadas 24 horas após preparo e armazenadas à temperatura ambiente (n=3).

O comportamento de fluxo deste tipo de fluido é refletida pelo índice de fluxo (n) (KIM *et al.*, 2003). Existem vários modelos que podem ser utilizados para estabelecer o valor de n em diferentes sistemas não-newtonianos. Sendo que, a escolha do modelo mais adequado depende da resposta do fluido à deformação e quão bem os dados experimentais se ajustam ao modelo utilizado. O modelo de Ostwald, assim como o de Herschel-Bulkley, considera a relação não linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento. Porém, este modelo não leva em consideração a tensão limite de escoamento (σ_0) (TONELI *et al.*, 2005). Em função da semelhança entre os modelos, com exceção de um coeficiente linear na equação matemática, ambos apresentaram ajustes com valores de $R^2 > 0,99$. No entanto, a utilização do modelo de Ostwald leva à perda de uma importante informação para a avaliação de protetores solares (σ_0) (STEFFE, 1996). Portanto, neste estudo, os reogramas obtidos foram analisados pelo modelo de Herschel-Bulkley, e os valores médios calculados para o índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e tensão limite de escoamento (σ_0), após 24 horas de preparo, estão indicados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores (média $\pm$ DP) para o índice de consistência (K), índice de fluxo (n) e tensão limite de escoamento (σ_0), para as formulações FVE, FVN, FFE e FFAN, após 24 horas de preparo ($n=3$).

Formulação	K (Pas ^{n})	n	σ_0 (Pa)	Área de histerese (dina/cm ² s)
FVE	38,69 $\pm$ 15,22	0,45 $\pm$ 0,07	439,80 $\pm$ 53,35	36.265 $\pm$ 3.819
FVN	26,15 $\pm$ 8,15	0,58 $\pm$ 0,04	431,90 $\pm$ 13,42	15.819 $\pm$ 4.421
FFE	90,31 $\pm$ 18,24	0,37 $\pm$ 0,03	295,50 $\pm$ 11,70	31.685 $\pm$ 3.224
FFAN	265,77 $\pm$ 19,96	0,21 $\pm$ 0,01	253,73 $\pm$ 34,79	44.468 $\pm$ 1.400

Como pode ser observado, todos os valores referentes ao índice de fluxo foram menores que 1, corroborando com a classificação das formulações como não-newtoniano e pseudoplástico. Valores de $n = 1$, indicam comportamento Newtoniano, enquanto valores de $n > 1$, indicam comportamento plástico. Comportamento de fluido pseudoplástico, considerando o modelo de Herschel-Bulkley, significa que os sistemas começam a fluir até atingir a tensão limite de escoamento e, além deste valor, a viscosidade das formulações diminui com o aumento da tensão de cisalhamento (KHURANA *et al.*, 2013).

Com relação à adição do DMC-NLS à formulação FVN, observou-se maiores valores de n para esta formulação comparado com o veículo (FVE). Resultados similares foram relatados por SILVA *et al.* (2012) e KHURANA *et al.* (2013), que relacionaram o aumento nos valores de n , com maiores valores da tensão limite de escoamento; no entanto, não foi observado diferença significativa para σ_0 entre estas formulações, conforme demonstrado na Tabela 10. Por outro lado, as formulações FFE e FFAN apresentaram menores valor de n comparado com FVE e com FNE, após 24 horas de preparo. Neste caso, podemos sugerir que existe uma relação indireta entre os valores de n e K , uma vez que quanto menores os valores de n , maiores foram os valores de K .

Foi observado que a formulação FVN, contendo as DMC-NLS, apresentou menor consistência comparado com FVE, e resultado similar foi previamente relatado na literatura ao se incorporar NLS em formulações semi-sólidas (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, após a adição dos filtros solares (FFE) e *Spirulina* (FFAN), houve aumento significativo nos valores de K , comparado com FVE. Esta é uma característica desejável para uma formulação fotoprotetora, uma vez que

formulações com maior consistência podem resultar em melhor eficácia fotoprotetora, já que o consumidor tende a aplicar uma camada mais espessa do produto, promovendo a formação de um filme mais efetivo na superfície da pele (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; NESSEEM, 2011).

Outro fator importante que deve ser considerado, é a área de histerese dos protetores solares, que estão relacionados com a tixotropia destas formulações. Tixotropia é um parâmetro importante para formulações semissólidas de aplicação tópica, indicando a variação reversível da viscosidade com o tempo (LEE *et al.*, 2009; NESSEEM, 2011). Neste estudo, este parâmetro foi calculado como sendo a área entre as curvas ascendente e descendente dos reogramas obtidos para cada formulação. Foi observado que todas as formulações apresentaram tixotropia, sendo que a formulação FFAN, apresentou maiores valores comparado com FVE, FVN e FFE, conforme demonstrado na Figura 7 e na Tabela 10. Este resultado sugere que, quando usados em associação, os filtros solares, *Spirulina* e DMC-NLS melhoram a tixotropia da formulação. Ao passo que quando utilizados isoladamente, ambos reduziram os valores da área de histerese.

Esta característica é típica para as formulações contendo partículas em suspensão, e é desejável, uma vez que pode facilitar a aplicação local sobre a pele (LEE *et al.*, 2009). Quando a formulação é sujeita à uma tensão de cisalhamento, sua estrutura quebra, levando a uma redução gradual da viscosidade a fim de espalhar o produto sobre a pele. E quando esta tensão de cisalhamento é removida, a viscosidade é recuperada lentamente e o aumento da viscosidade é mantido para que a formulação permaneça sobre a pele e não escorra (LIU *et al.*, 2008).

Pensando no produto final, um protetor solar deve ser de fácil espalhabilidade, mas viscoso o suficiente para formar um filme coerente sobre a pele. Portanto, deve-se sempre levar em conta durante a formulação de um produto de uso tópico, a sua consistência e sensação ao toque. O ideal é que as emulsões tenham propriedades reológicas de plasticidade/pseudoplasticidade e tixotropia (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; LEE *et al.*, 2009), ou seja, em repouso sua viscosidade é aumentada e sob agitação diminuída. Logo, os resultados deste estudo, sugerem que a formulação desenvolvida acrescida da *Spirulina* e DMC-NLS, apresentou propriedades reológicas desejáveis para um protetor solar, mesmo após 28 dias de armazenamento.

A variação do comportamento de fluxo das formulações, bem como dos parâmetros n , K , σ_0 e área de histerese, em função do tempo e da temperatura, então ilustrados, respectivamente, nas Figuras 8-12. Após 28 dias de armazenamento foi observado que as formulações apresentaram o mesmo comportamento reológico (não-newtoniano e pseudoplástico), para todas as temperaturas avaliadas, e os valores de n confirmaram tal comportamento, conforme ilustrado nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Figura 8: Taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento das formulações A) FVE, B) FVN, C) FFE e D) FFAN, avaliadas 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas ($n=3$).

Figura 9: Valores do índice de fluxo (n ; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas ($n=3$).

Figura 10: Valores do índice de consistência (K ; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas ($n=3$).

Figura 11: Valores da tensão limite de escoamento (σ_0 ; média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).

Figura 12: Valores da área de histerese (média $\pm$ DP) para as formulações A) FVE, B) FVN; C) FFE e D) FFAN avaliadas 0, 7, 14, 21 e 28 dias após armazenamento em diferentes temperaturas (n=3).

As formulações FVE, FVN e FFE apresentaram maiores valores de K após 28 dias de armazenamento, e este comportamento é justificado pelo agente emulsificante usado na formulação, que tem a propriedade de aumentar sua viscosidade com o tempo (Croda Ltda). No entanto, a formulação FFAN apresentou uma queda brusca dos valores de K após 7 dias para todas as temperaturas avaliadas, seguido por um aumento destes valores após 28 dias. Desta forma, podemos sugerir que, quando utilizados em associação, os filtros solares, a *Spirulina* e o DMC-NLS, alteraram o comportamento e a estrutura organizacional do agente emulsionante. Consequentemente, esta formulação precisou de 7 para organizar sua estrutura e se tornar estável. Resultados similares foram previamente reportados por GASPAR & MAIA CAMPOS (2003), que utilizaram a mesma base autoemulsionante.

Podemos sugerir que as formulações FVN e FFAN apresentaram maior estabilidade que as outras formulações estudadas, uma vez que os parâmetros reológicos analisados apresentaram menor variação com o tempo, em todas as temperaturas avaliadas. Desta forma, a incorporação do DMC-NLS e da *Spirulina* nas formulações FVN e FFAN contribuíram para o aumento da sua estabilidade com o tempo (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003; GIANETI *et al.*, 2012).

6.5 Padronização do método de quantificação

A Figura 13 mostra o perfil cromatográfico de uma solução dos filtros solares, BEMT (5), MBBT (4), DHHB (3) e EHT (2) e do antioxidante DMC (1) em fase móvel composta por uma mistura de água MiliQ acidificada com ácido fosfórico:álcool etílico (1:1 v/v). A eluição foi realizada sob fluxo por gradiente a 0,7 mL/min, com detecção a 220 e 312 nm, temperatura do compartimento da coluna de 40°C, volume de injeção de 10µL e tempo total de corrida fixado em 30,5 min. Nestas condições os tempos de retenção obtidos para 1, 2, 3, 4 e 5 foram, respectivamente, de 9,4 min, 12,5 min, 15,0 min, 16,5 min 19,0 min. E a resolução entre os compostos se mostrou adequada para a continuidade do trabalho.

Figura 13: Perfil cromatográfico da solução de trabalho contendo o antioxidante DMC (1) e os filtros solares DHHB (2), EHT (3), MBBT (4), BEMT (5), nas concentrações de 50,0 µg/mL, à 312 nm (linha cinza) e 220 nm (linha preta).

Legenda: DHHB: Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (Uvinul APlus®); EHT: ethylhexyl triazone (Uvinul T150®); MBBT: Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (Tinosorb M®); BEMT: Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (Tinosorb S®).

Neste estudo, para padronização do método, foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade e intervalo, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), e exatidão (BRASIL - ANVISA, 2003). Na avaliação da seletividade, em todas as amostras testadas, não foram encontrados compostos com o mesmo tempo de retenção dos filtros solares estudados (Figura 14). A seletividade é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que fornece informações sobre a ocorrência de interferentes durante a determinação dos analitos (BRASIL - ANVISA, 2003). Ademais, a avaliação da seletividade antes da realização de ensaios de quantificação pode contribuir por assegurar a exatidão do método.

Figura 14: Avaliação da seletividade do método em A) tampão fosfato pH 7,4 + 4% albumina bovina; B) formulação FFAN e C) pele de orelha de porco; 1) EHT, 2) DHHB, 3) MBBT, 4) BEMT.

Para todos os analitos, no intervalo de linearidade avaliado (10,0 - 50,0 µg/mL), a regressão linear apresentou coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método, conforme representado na Figura 15. Com base nos resultados da linearidade, foram estimados os parâmetros limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os dados estão apresentados na Tabela 12. O limite de detecção é considerado a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com exatidão. Por outro lado, entende-se por limite de quantificação como sendo a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão (Brasil - ANVISA, 2003).

Tabela 12: Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) obtidos segundo metodologia analítica desenvolvida para quantificação dos filtros solares e antioxidante estudados.

Analito	LQ (µg/mL)	LD (µg/mL)
BEMT	4,25	1,40
MBBT	1,21	0,40
DHHB	0,30	0,10
EHT	0,87	0,28
DMC	5,64	1,87

Figura 15: Curvas padrão média obtidas para A) BEMT, B) MBBT, C) DHHB, D) EHT e E) DMC, usando a metodologia analítica desenvolvida por CLAE.

As Tabelas 13 e 14 apresentam valores de desvio padrão relativo intra-corrida e intercorrida (precisão), assim como os valores de exatidão intra-corrida e intercorrida calculados nas concentrações estudadas, para os diferentes analitos. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Já a exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os valores de desvio padrão relativo encontrados foram menores que 5% e, por isso, considerados satisfatórios. Os valores encontrados para a exatidão foram muito próximos a 100%, mostrando a alta confiabilidade do método (Brasil - ANVISA, 2003). Assim, os resultados obtidos atestam a precisão e exatidão do método.

Tabela 13: Resultados obtidos para o parâmetro precisão para os analitos estudados.

Concentração (µg/mL)	DRP intra-corrida					DRP inter-corrida				
	TM	TS	UP	UT	DMC	TM	TS	UP	UT	DMC
10	1,29	1,17	1,25	1,32	2,31	2,59	1,99	2,87	3,05	3,79
30	1,70	1,72	1,70	1,66	1,00	3,02	3,39	2,82	2,81	1,54
50	1,90	1,86	1,85	1,86	1,51	2,15	2,13	2,10	2,19	2,02

Tabela 14: Resultados obtidos para o parâmetro exatidão para os analitos estudados.

Concentração (µg/mL)	Exatidão intra-corrida					Exatidão inter-corrida				
	TM	TS	UP	UT	DMC	TM	TS	UP	UT	DMC
10	99,84	101,60	100,70	101,37	103,04	100,80	102,39	103,64	99,61	104,70
30	100,67	100,03	100,22	100,07	98,71	100,24	100,03	100,72	99,05	97,88
50	100,11	99,48	99,90	100,18	99,80	100,51	99,48	100,83	100,11	100,98

As Tabelas 15-17 apresentam os resultados do ensaio de recuperação dos filtros solares a partir da pele de orelha de porco (EC e D+E) e da formulação cosmética (FFAN), para posterior avaliação da penetração cutânea dos filtros solares. Os resultados confirmam uma recuperação satisfatória em todos os níveis de concentração, considerando que são compostos altamente lipofílicos e de difícil solubilização. Esses resultados são importantes, uma vez que garantem a confiabilidade dos resultados relacionados a quantificação das substâncias estudadas retidas na pele de orelha de porco durante os estudos de penetração e retenção cutânea.

Tabela 15: Porcentagem de recuperação (média ± DP) para os filtros solares à partir do estrato córneo da pele de orelha de porco (n=3).

Concentração (ug/mL)	BEMT (%)	MBBT (%)	EHT (%)	DHHB (%)
10	97,98 ± 0,15	104,12 ± 0,15	103,20 ± 0,15	110,26 ± 0,04
30	89,53 ± 1,08	93,03 ± 1,08	94,94 ± 1,08	101,91 ± 0,14
50	86,46 ± 0,72	89,79 ± 0,71	93,40 ± 0,71	100,88 ± 0,17

Tabela 16: Porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) para os filtros solares à partir da D+E da pele de orelha de porco (n=3).

Concentração (ug/mL)	BEMT (%)	MBBT (%)	EHT (%)	DHHB (%)
10	101,59 $\pm$ 1,25	96,66 $\pm$ 0,48	97,70 $\pm$ 0,28	94,92 $\pm$ 0,02
30	84,72 $\pm$ 6,9	87,96 $\pm$ 1,36	87,79 $\pm$ 6,99	88,58 $\pm$ 0,42
50	93,82 $\pm$ 7,01	84,36 $\pm$ 1,45	88,23 $\pm$ 3,71	87,80 $\pm$ 0,28

Tabela 17: Porcentagem de recuperação (média $\pm$ DP) para os filtros solares à partir da formulação FFAN, (n=3).

Concentração (ug/mL)	BEMT (%)	MBBT (%)	EHT (%)	DHHB (%)
30	100,59 $\pm$ 0,03	99,20 $\pm$ 3,20	82,67 $\pm$ 0,03	115,93 $\pm$ 0,12

6.6 Estudos *ex vivo* da penetração cutânea da formulação

Neste estudo foram empregados diferentes métodos para avaliação do grau de penetração cutânea dos filtros solares e antioxidantes da formulação FFAN, que podem ser usados de forma complementar para obtenção de resultados mais conclusivos. Ambos os estudos foram realizados em pele de orelha de porco, que é um modelo altamente adequado à pele humana.

O estudo de penetração e retenção cutânea usando células de difusão de Franz associado à um método de quantificação por CLAE, permite a determinação quantitativa do grau de penetração de cada filtro solar presente na formulação. No entanto, avaliação dos demais ingredientes da formulação se torna inviável, em função da composição complexa dos protetores solares. Este método consiste em avaliar a difusão de uma substância através de uma membrana até um fluido receptor. Neste estudo foi escolhido o tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 4,0% de soro albumino bovino como solução receptora, uma vez que permite a maior solubilização dos filtros estudados, sem prejudicar a integridade da membrana, o que poderia diminuir a confiabilidade dos resultados (SCCS, 2010; FREITAS *et al.*, 2015).

Por outro lado, a microscopia Confocal Raman (MCR), é um método óptico não invasivo e uma técnica muito útil para determinação de perfis de profundidade, uma vez que fornece informações detalhadas sobre a composição molecular da pele até

a profundidade de 100 μm da superfície. Desta forma, baseada no espectro Raman obtido para cada amostra, a distribuição das substância na pele é determinada baseada em sua composição química, o que significa que possui alta especificidade molecular (CASPER *et al.*, 2001; ASHTIKAR *et al.*, 2013; ASCENCIO *et al.*, 2016).

Portanto, comparando com o experimento em células de difusão de Franz, este último deve usar um fluido receptor adequado, considerando a alta lipofilicidade dos filtros UV. No entanto, as condições experimentais neste caso, devido a hidrofiliicidade muito elevada dos fluidos receptores, não permite uma boa recuperação destas moléculas da pele (TOUITOU & GODIN *et al.*, 2008).

Exemplos de um espectro Raman obtido para a pele tratada e não-tratada com a formulação FFAN após 1 hora de penetração, em diferentes profundidades, usando MCR, está representado na Figura 16. Nestes exemplos foi observado que a intensidade dos sinais provenientes da formulação diminuíram até a profundidade de, aproximadamente, 8 μm , o que significa que a formulação não penetrou mais profundamente na pele. Desta forma, usando estes espectros e aplicando o método AMN, a profundidade de penetração da formulação FFAN pôde ser determinada.

Figura 16: Espectros Raman obtidos por MCR para pele de orelha de porco tratada (linha azul) e não tratada (linha verde) com a formulação FFAN após 1 hora de penetração, nas profundidades de A) 2 μm , B) 6 μm e C) 8 μm .

Os resultados encontrados para o estudo de penetração e retenção cutânea para os filtros solares avaliados em células de difusão de Franz estão representados na Tabela 18. De acordo com este método, não foi observado permeação de nenhum dos filtros solares até a solução receptora e todos apresentaram maior

porcentagem retida no EC, com pequena retenção nas camadas da D+E. Exceto o MBBT, que não foi encontrado nas camadas da D+E. A medida de resistência da pele de orelha de porco ($58,6 \pm 14,07 \text{ K}\Omega$), garantiu a integridade da pele utilizada e a confiabilidade dos resultados.

Tabela 18: Quantidade de filtro solar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; média $\pm$ DP) encontrada na solução receptora, SC e D+E após estudos de penetração e retenção cutânea *ex vivo* para a formulação FFAN.

Filtro solar	MBBT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	BEMT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	DHHB ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	EHT ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
EC	$32,53 \pm 4,18$	$27,45 \pm 2,30$	$22,39 \pm 2,71$	$3,24 \pm 0,51$
D+E	n.d.	$7,31 \pm 1,49$	$9,70 \pm 3,60$	$2,69 \pm 0,56$
Solução receptora	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*n.d.: Não determinado

O perfil de penetração obtido por MCR para a formulação FFAN está representado na Figura 17. De acordo com este método, a concentração máxima da formulação FFAN é observada na superfície da pele, diminuindo até desaparecer completamente na profundidade de $10,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$ e $11,2 \pm 3,0 \mu\text{m}$, após 1 e 6 horas de penetração, respectivamente. Portanto, estes resultados mostram que a maioria dos ingredientes da formulação ficaram retidos no EC, e não penetraram profundamente nas camadas viáveis da pele. Mesmo após 6 horas de penetração, os ingredientes do protetor solar permaneceram na superfície da pele e não foi observada diferença significativa após 1 hora de penetração, reforçando os resultados obtidos por células de difusão de Franz para a penetração dos filtros solares.

Figura 17: Perfil de penetração cutânea da formulação FFAN em pele de orelha de porco, após 1 e 6 horas de penetração, avaliada por Microscopia Confocal Raman (n=5).

As propriedades físico-químicas de cada filtro são fatores importantes para a penetração cutânea. Boa porcentagem de penetração cutânea é alcançada quando o $\log P_{o/a}$ (coeficiente de partição n-octanol/água) das moléculas está na faixa de 2-5. Dentro destes valores, o balanço hidrofílico/lipofílico é bom o suficiente para permitir uma difusão passiva da molécula dentro da pele. Se a molécula tiver um coeficiente de partição muito baixo, ela será tão solúvel na água, que não atravessará a barreira do EC. Mas se o $\log P_{o/a}$ for muito alto, a molécula será tão lipossolúvel que ficará retida no EC e não será capaz de passar através das camadas da pele, que é um ambiente rico em água (VERVARESOU, 2006; PUGLIA *et al.*, 2014).

Neste sentido, se compararmos a penetração do DHHB com os demais filtros, podemos observar que maior quantidade foi encontrada na D+E. Esta molécula possui um $\log P_{o/a}$ igual a 6,2 e pequeno peso molecular (297 g/mol), o que justifica tal resultado, apesar de estar presente em menor concentração na formulação. Já o BEMT (628 g/mol) e o EHT (823 g/mol), presentes na mesma concentração, apresentam $\log P_{o/a}$ igual a 5,4 e 8,1, respectivamente. Desta forma, o maior peso molecular e $\log P_{o/a}$ do EHT pode ter sido o motivo da menor penetração deste filtro no EC e D+E, comparado com os demais filtros. O filtro MBBT (659 g/mol) possui $\log$

$P_{o/a}$ igual a 12,7, pouco favorável à penetração cutânea, o que justifica sua retenção apenas no EC, apesar de possuir propriedades físico-químicas similares ao BEMT. Além disso, este filtro estava presente em menor concentração na formulação (3,0% de substância ativa). Todos os filtros avaliados possuem alta substantividade pela queratina, o que é entendido como a habilidade de uma substância de ser ad- ou absorvida pelos substratos de queratina na epiderme, resultando em uma mínima absorção percutânea (VERVARESOU, 2006; PUGLIA *et al.*, 2014;). Portanto, a diferente afinidade dos filtros solares pelo EC também pode explicar os resultados obtidos para cada filtro neste estudo.

Os resultados encontrados neste estudo, usando MCR e células de difusão de Franz, estão de acordo com relatos na literatura e com a legislação vigente sobre protetor solar, onde têm sido demonstrado que filtros UV devem permanecer nas camadas superficiais da pele visando protegê-la dos efeitos nocivos da radiação solar. Por outro lado, se os filtros solares atingirem a derme e a corrente sanguínea, há um grande risco do desenvolvimento de reações alérgicas e fotoalérgicas, bem como outros efeitos tóxicos sistêmicos (BRASIL, 2012c; FREITAS *et al.*, 2015). Outros relatos na literatura têm demonstrado resultados semelhantes para os mesmos filtros UV, reforçando os resultados deste estudo (HAQUE *et al.*, 2016; ADLHART & BASCHONG, 2011; DURAND *et al.*, 2009). HAQUE *et al.* (2016) demonstraram uma profundidade de penetração de $3,31 \pm 0,78 \mu\text{m}$ e $3,57 \pm 0,86 \mu\text{m}$ para DHHB e BEMT, respectivamente, após 12 horas de penetração em pele da orelha de porco, detectáveis por *Tape Stripping*. Enquanto ADLHART & BASCHONG (2011) demonstraram que 30,2% e 42,5% do filtro MBBT ficaram retidos, respectivamente, na superfície da pele e no EC da pele humana após análise por MCR.

É importante mencionar que os protetores solares modernos são frequentemente formulados usando dois ou mais filtros solares, com o objetivo de aumentar o efeito protetor da formulação contra os raios UV abrangendo a região do UVA e UVB do espectro solar. Esta aplicação simultânea de filtros solares em uma mesma formulação não é isenta de risco e pode produzir efeitos secundários nocivos devido a um potencial aumento da absorção percutânea dos filtros solares (PUGLIA *et al.*, 2014). Além disso, a extensão da penetração de um filtro solar no EC é fortemente dependente das propriedades do veículo e do tempo de exposição, sendo que as emulsões podem agir como promotores de penetração, favorecendo a

partição do filtro solar para dentro o EC (ROUSSEL *et al.*, 2015). No entanto, estes efeitos não foram observados neste estudo, em ambas as metodologias empregadas, garantindo a segurança da formulação, uma vez que todos os filtros permaneceram na superfície da pele, onde é intencionado de agir *in vivo*.

6.7 Avaliação da eficácia *ex vivo*

6.7.1 Determinação do potencial antioxidante

Os valores do potencial antioxidante indicam a capacidade de uma formulação em proteger contra a formação radicalar na pele (MEINKE *et al.* 2011). Os valores encontrados para as formulações FFE e FFAN foram respectivamente, $32,0 \pm 1,0 \times 10^4$ radicais/mg e $77,0 \pm 4,0 \times 10^4$ radicais/mg. Logo, um valor muito menor foi observado para a formulação FFE; o que é justificável devido aos ingredientes adicionados para prevenir sua oxidação (como o BHT, por exemplo), uma vez que nenhuma outra substância AO foi adicionada à esta formulação. Enquanto a formulação FFAN, contem uma combinação dos AO, *Spirulina* (0,1% p/p) e DMC-NLS (DMC à 0,05% w/w).

Em um estudo anterior, MEINKE *et al.* (2011) demonstraram que o potencial antioxidante de formulações de protetores solares comerciais, obtiveram valores entre 40 a 119×10^4 radicais/mg, comparado com uma formulação padrão do COLIPA, que não apresenta atividade antioxidante, com valor de 20×10^4 radicais/mg. Portanto, podemos concluir que a formulação FFAN, apresentou um valor intermediário comparado às marcas comerciais, o que representa uma boa atividade antioxidante, o que significa uma boa proteção da pele, o que foi também confirmado, nos estudos *ex vivo* de formação radicalar, discutido à seguir.

6.7.2 Avaliação *ex vivo* da formação radicalar

A avaliação da formação radicalar (FR) na pele pode ser entendida como uma forma indireta de avaliar os danos causados pela exposição à radiação solar, uma vez que a produção de radicais livres é a principal causa do envelhecimento cutâneo e, ainda, está relacionada com o desenvolvimento do câncer de pele (FUCHS *et al.*,

1998; AKHALAYA *et al.*, 2014). Consequentemente, novas estratégias para proteção contra a FR, devido à exposição solar, tem sido avaliadas e se tornado cada vez mais importantes. Neste estudo, espectroscopia RPE foi realizada para a detecção de radicais livres usando PCA como marcador. E desta forma, a FR é manifestada pela redução do sinal do PCA detectado por espectroscopia RPE (HERRLING *et al.*, 2006; MEINKE *et al.*, 2011; MEINKE *et al.*, 2013). Os resultados obtidos para a FR estão indicados nas Figuras 18 e 19. Como pode ser observado, houve maior FR após irradiação na região do UV, seguido pela região VIS e IV, o que está de acordo com relatos anteriores da literatura (ZASTROW *et al.*, 2009; MEINKE *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado que a FR na pele após exposição à radiação solar é distribuída como segue: 64% na região UV (17% UVB e 47% UVA) e 36% nas regiões do VIS e IV (ZASTROW *et al.*, 2009). Adicionalmente, neste estudo, a FR apenas no IV foi avaliada separadamente e se mostrou muito menor quando comparada com o estresse oxidativo gerado nas regiões UV e VIS.

Figura 18: Formação radicalar cumulativa (média $\pm$ DP) em função do tempo, em pele de orelha de porco, para as formulações FFE e FFAN, após exposição à A) radiação UVA/UVB; B) radiação VIS e C) radiação IV (n=10).

Diferença significativa em relação à pele desprotegida - (*) $p \leq 0.1$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$, teste t Student.

Figura 19: Formação radicalar cumulativa (média $\pm$ DP) após 6 minutos de exposição à radiação UVA/UVB, VIS e IV, em pele de orelha de porco para as formulações FFE e FFAN (n=10).

Diferença significativa em relação à pele desprotegida - (*) $p \leq 0.1$, (***) $p \leq 0.001$, teste t Student; Diferença significativa entre a radiação UV, VIS e IV na pele desprotegida - (**) $p \leq 0.01$, teste t Student.

Também foi observado que a FR foi significativamente reduzida após aplicação do protetor solar para ambas as formulações avaliadas, contendo ou não AO, mas não pôde ser completamente evitada. Para ambos os cremes, maior proteção foi observada na região UV e nós não verificamos diferença significativa entre FFAN e FFE. Este resultado pode ser explicado com base nas características dos filtros UV orgânicos utilizados nas formulações (Tabela 5), que proporcionam proteção principalmente na região UV. BEMT e MBBT são absorvedores da radiação UV de amplo espectro, eficazes contra os raios UVA e UVB; DHHB é um filtro UVA e EHT é um filtro UVB. Assim, esta combinação de filtros UV proporciona uma boa proteção na região UV e, conseqüentemente, evita a geração de ERO's induzidas pela luz UV na pele. Vários estudos têm demonstrado que protetores solares contendo filtros UV são eficazes na redução do risco de desenvolver cancer da pele e, conseqüentemente, o fotoenvelhecimento (SARGENT *et al.*, 2016; AGBAI *et al.*, 2014.).

Além disso, o filtro MBBT, formulado comercialmente como Tinosorb M[®], também contém na sua composição o dióxido de titânio (TiO₂), um filtro UV inorgânico que é capaz de dispersar a luz UV e VIS, o que poderia explicar a ligeira

protecção observado no VIS para a formulação FFE. No entanto, uma protecção significativamente maior foi observada na região VIS para a formulação FFAN, contendo AO. Este resultado pode ser explicado devido à presença dos AO (*Spirulina* 0,1% p/p e DMC-SLN 10% p/p) adicionados a esta formulação, capazes de neutralizar os radicais livres formados após irradiação no VIS, aumentando a protecção nessa região comparado com a formulação FFE. Efeito sinérgico entre filtros inorgânicos e AO já foi previamente demonstrado na região VIS (MEINKE *et al.*, 2013), de acordo com os resultados do presente estudo. Além disso, é importante notar que a *Spirulina* apresenta forte capacidade de dispersão na região VIS (PHONGAMWONG *et al.*, 2015), o que faz com que este AO também se comporte como um filtro inorgânico, aumentando a protecção nessa região. Há evidências crescentes de que a luz visível pode danificar a pele humana (RANDHAWA *et al.*, 2015; LIEBEL *et al.*, 2012; MAHMOUD *et al.*, 2008). LIEBEL *et al.* (2012), também demonstrou que protetores solares contendo antioxidantes foi eficaz na prevenção contra as ERO's induzidas pela luz VIS.

Por outro lado, a formação de radicais livres na região do IV foi muito menor em comparação com as regiões UV e VIS. Não foi observada protecção significativa para a formulação FFE, mas pequena protecção foi observada para a formulação FFAN (Fig. 2), o que também pode ser sugerido devido à atividade antioxidante dos AO presentes nesta formulação. Resultado semelhante foi relatado por MEINKE *et al.* (2013), que sugeriram antioxidantes para proteger contra os raios IV-A, mas a protecção observada contra a formação de radicais também foi muito pequena. Vários estudos têm discutido o efeito da radiação IV, especialmente IV-A, na pele humana (GRETHER-BECK *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2009; SCHIEKE *et al.*, 2002; SCHROEDER *et al.*, 2008). No entanto, outros autores afirmam que estes resultados ainda não permitem uma compreensão precisa dos efeitos do IV-A na pele humana e mais estudos são necessários para elucidá-los (BAROLET *et al.*, 2016; PIAZENA *et al.*, 2010).

Um dos principais questionamentos com relação a estes resultados é que a fonte de luz IV artificial utilizada nem sempre são representativos da intensidade da radiação solar natural à que estamos expostos diariamente, o que coloca em dúvida a aplicabilidade em uma situação real sobre os efeitos deletérios do IV-A à curto e longo prazo. Em nossos estudos, uma dose de irradiação IVA igual a 8,4 J/cm² foi aplicada o que equivale à aproximadamente 7 minutos de exposição solar,

considerando que a radiação IVA em um dia de sol é de, aproximadamente, 21,6 mW/cm². Portanto, os resultados apresentados neste estudo permitem uma extrapolação realística para uma condição *in vivo*. Da mesma forma, considerando que a radiação solar na região VIS corresponde à aproximadamente 39 mW.cm², a dose utilizada neste estudo para a região VIS (10,6 J/cm²) é equivalente à aproximadamente 5 minutos de exposição ao sol e, portanto, também permite uma extrapolação realística dos resultados deste estudo com relação à radiação VIS e seus danos (PIAZENA & KELLEHER, 2010; RANDHAWA *et al.*, 2015; BAROLET *et al.* 2016).

A FR na pele é um processo direto que pode ocorrer tanto na superfície, quanto nas camadas mais profundas da pele. Se nenhum protetor solar é aplicado, os radicais livres podem ser formados no EC, na epiderme e na derme. Mas, a aplicação de protetores solares leva à formação de uma camada protetiva sobre a pele e, neste caso, a radiação solar residual, que não foi refletida ou absorvida pelos filtros solares, podem promover a formação de EROs na pele. Quando o protetor solar contém AO, essas EROs são imediatamente neutralizadas. Além disso, as próprias moléculas dos AO podem apresentar a capacidade de refletir a radiação solar, diminuindo a incidência da radiação na pele, como é o caso da *Spirulina*. Nestas condições, os agentes antioxidantes endógenos presentes no tecido cutâneo, também ficam protegidos e neutralizam os radicais livre gerados de forma mais eficiente do que na pele desprotegida. Portanto, a redução do estresse oxidativo na pele pode ser alcançado em dois níveis diferentes: diminuindo os efeitos negativos gerados pela radiação solar e/ou aumentando os níveis de antioxidantes, com o objetivo de neutralizar as ERO (SCHROEDER *et al.*, 2008; KRUTMANN *et al.*, 2012).

Portanto, podemos sugerir que a formulação FFAN aumentou a proteção contra a FR induzida pela radiação solar em pele de orelha de porco, em todo o seu espectro de radiação: UV, VIS e IV; demonstrando a vantagem da associação de filtros UV e AO.

6.8 Determinação do FPS *in vivo/in vitro* e avaliação da proteção UVA *in vitro*

Segundo RDC n° 30 de 2012, os protetores solares devem apresentar, no mínimo, FPS > 6; proteção UVA igual a 1/3 do valor do FPS declarado, ou seja, razão UVA/UVB > 0,6; e o valor do comprimento de onda crítico (λ_c) > 370 nm (BRASIL, 2012b). Neste estudo foram determinados o FPS *in vivo* e *in vitro*, a relação UVA/UVB *in vitro* e o λ_c , para as formulações FFE e FFAN. Os resultados estão indicados na Tabela 19, e o espectro de absorção obtido para a formulação FFAN, está ilustrado na Figura 20. O valor do FPS determinado para a fórmula padrão da COLIPA correspondeu ao seu FPS teórico e o valor de IC (%) foi menor que 17,0% para todas as formulações, validando o teste do FPS *in vivo* para as formulações FFE e FFAN.

Tabela 19: Valores obtidos para o FPS *in vivo/in vitro*, e proteção UVA *in vitro* para as formulações FFAN e FFE.

Produto	FPS <i>in vivo</i>				FPS <i>in vitro</i>	Proteção UVA <i>in vitro</i>		
	Amostra		Padrão COLIPA			Razão UVA/ UVB	<i>Boot's Star</i>	λ_c (nm)
	Valor	IC(%)	Valor	IC (%)				
FFE	31,2 ± 5,0	15,3	14,3 ± 3,1	15,3	71,9 ± 14,9	0,71	Boa (***)	378
FFAN	33,6 ± 4,4	9,4	14,0 ± 3,0	15,5	101,3 ± 17,5	0,72	Boa (***)	378

Figura 20: Espectro de absorção da formulação FFAN na região do UV.

Não foi observada diferença significativa no valor do FPS *in vivo* entre as formulações FFE e FFAN. Como o FPS é um número inteiro, pode-se concluir que o

FPS de ambas as formulações é 30. O FPS determinado *in vivo* correspondeu ao valor do FPS calculado *in silico*, durante a etapa do desenvolvimento, item 4.2.1.1; no entanto, foi significativamente diferente do valor do FPS determinado *in vitro*. Outros estudos têm demonstrado que os métodos de determinação *in vitro* do FPS não apresentam boa correlação com o método *in vivo*. No entanto, podem ser utilizados durante a etapa de desenvolvimento de protetores solares, uma vez que permitem a comparação qualitativa entre diferentes combinações de filtros solares. Esse resultado conflitante entre as duas metodologias pode ser explicado pelo fato de que o FPS *in vivo* utiliza um marcador biológico como uma resposta individual e variável à radiação UVB, que é o eritema; ao passo que o FPS *in vitro*, se baseia na medida da transmitância da luz UV através da placa de PMMA (substrato). Portanto, apesar de ambas as metodologias fornecerem um valor de FPS, possuem princípios diferentes e, portanto, não apresentam uma relação linear; conforme previamente demonstrado por BENDOVÁ *et al.* (2007).

Desta forma, considerando que o valor do FPS *in vivo* se refere à proteção quanto a formação de eritema, não foi possível verificar através deste ensaio, a maior proteção radicalar oferecida pela formulação FFAN, discutido no item 6.7.2. Além disso, também não foi observada nenhuma proteção adicional contra a radiação UV devido às DMC-NLS (10% v/p) incorporadas na formulação FFAN; ao contrário do que foi observado no teste *in vitro*, uma vez que a formulação FFAN apresentou maior FPS *in vitro*. Já foi previamente demonstrado por métodos *in vitro* que NLS são capazes de refletir a radiação UV, devido à sua característica particulada, o que poderia melhorar a fotoproteção *in vivo* (WISSING & MULLER, 2001). No entanto, este efeito não foi observado na determinação do valor do FPS *in vivo*.

Com relação à proteção UVA *in vitro*, foi observado que, através da razão UVA/UVB e do λ_c , ambas as formulações ofereceram igual proteção. Ainda, o espectro de absorção da formulação FFAN confirma estes resultados, uma vez que a absorção máxima na região UVB foi de aprox. 0,3, e a absorção máxima na região UVA foi de aprox. 0,18 (maior que 1/3 de 0,3). Ainda, o λ_c obtido está dentro do valor previsto na RDC n° 30/2012 (BRASIL, 2012b). Quanto maior o valor de λ_c , maior será a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, λ_c não leva em consideração a intensidade de todo espectro, possibilitando que um filtro com

proteção inferior possa apresentar mesmo valor de λ_c que outro, com proteção superior. Por isso é importante avaliar todos os resultados obtidos no teste *in vitro*, para obtenção de resultados conclusivos e não super-estimados.

Apesar da formulação FFAN ter demonstrado os mesmos valores de FPS *in vivo* e proteção UVA, foi demonstrado maior propriedade de dispersão da luz UV comparado com a formulação FFE, uma vez que apresentou maior valor do FPS *in vitro* (% de transmitância da radiação UV). Além disso, o sistema AO presente na formulação FFAN demonstrou significativa proteção contra a formação radicalar após irradiação nas regiões UV, VIS e IV de forma mais eficiente que FFE, conforme discutido no item 6.7.2. Logo, podemos concluir que os valores de FPS *in vivo* e proteção UVA, exigidos pelos órgãos reguladores para protetores solares, não são suficientes para prever todos os mecanismos de proteção oferecido por um protetor solar de amplo espectro e que, formulações com o mesmo FPS *in vivo*, podem apresentar eficiência diferente ao combater os efeitos negativos associados à radiação solar em situações reais de exposição ao sol.

Este resultado corrobora com relatos anteriores de OSTERWALDER & HERZOG (2009), que defendem que o FPS *in vivo* (indicado no rótulo dos protetores solares) quantifica a proteção contra a queimadura solar, que é o sinal mais imediato e visível do dano causado pela radiação UVB. Assim, não podemos predizer, por este raciocínio, qual é a proteção oferecida contra a formação radicalar, o desenvolvimento de neoplasias cutâneas ou mesmo em relação aos efeitos relacionados ao fotoenvelhecimento. Portanto, métodos *in vitro* e *in vivo* fornecem resultados complementares para a previsão da proteção total oferecida por um protetor solar.

6.9 Avaliação da eficácia clínica *in vivo*

Estudos de eficácia clínica são realizados com o objetivo de comprovar os efeitos esperados pelos produtos cosméticos. Neste estudo, foi avaliado a eficácia clínica das formulações FFE e FFAN, ambas com FPS 30 e boa proteção UVA, em prevenir os sinais visíveis do fotoenvelhecimento, bem como o efeito protetor *in vivo* dos AO em associação com os filtros solares, usando técnicas de biofísica e análise de imagem da pele. Existem poucos relatos na literatura que demonstrem a eficácia

dessa associação após incorporação em formulações tópicas, bem como os reais efeitos na pele. Neste estudo, foi demonstrado, através dos estudos *ex vivo* de formação radicalar, discutido no item 6.7.2, que os AO melhoraram a proteção nas regiões UV, VIS e IV do espectro solar; no entanto, é igualmente importante verificar qual as implicações deste resultado *in vivo*, nas reais condições de uso do produto. Não foi realizado um grupo controle neste estudo (grupo que não aplicou nenhuma formulação fotoprotetora), devido à questões éticas.

Como relatado, o fotoenvelhecimento é consequência de uma série de danos causados à pele com o tempo, devido à exposição prolongada à radiação solar. Estes efeitos são menos pronunciados na epiderme, pois esta apresenta um processo constante de renovação celular. Em contraste, a derme é mais susceptível à esses danos, o que resulta na perda de elasticidade da pele (NATARAJAN et al., 2014). Portanto, avaliar a melhora nas condições da pele é uma alternativa interessante, que permite prever os reais efeitos das formulações FFE e FFAN *in vivo*. Dentre os sinais visíveis do fotoenvelhecimento, neste estudo foram investigados o conteúdo aquoso do EC (CAEC), a perda transepidérmica de água (TEWL), a elasticidade e a firmeza da pele, bem como a degradação das fibras de colágeno e elastina e a espessura da derme; cujos resultados (médias $\pm$ desvio padrão) estão expressos na Tabela 20, e são discutido detalhadamente nos itens à seguir.

Tabela 20: Variação dos parâmetros avaliados no estudo de eficácia clínica das formulações FFE e FFAN após 0, 28, 56 e 84 dias de tratamento.

Fórmulação/ Região	Parâmetro	T0	T28	T56	T84	Valor de p T0-T84
FFE Fronte	CAEC (u.a.)	50,7 ± 10,4	51,6 ± 10,4	55,2 ± 8,6	55,7 ± 10,6	n.s.
	TEWL	10,1 ± 1,9	10,0 ± 1,9	10,3 ± 2,1	9,5 ± 2,1	p < 0,1
	Espessura derme (µm)	1,68 ± 0,20	1,59 ± 0,16	1,57 ± 0,21	1,55 ± 0,19	p < 0,1
	PBE	18355 ± 4528	17901 ± 5080	15552 ± 5214	15406 ± 4774	p < 0,001
	PAE	5082 ± 1674	5350 ± 2740	5416 ± 1839	5734 ± 1899	p < 0,1
	Relação de ecogenicidade	0,21 ± 0,08	0,23 ± 0,09	0,24 ± 0,08	0,25 ± 0,23	p < 0,01
	R2	0,61 ± 0,07	0,64 ± 0,09	0,68 ± 0,11	0,69 ± 0,10	p < 0,01
	R5	0,52 ± 0,06	0,53 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,56 ± 0,09	p < 0,1
	R6	0,24 ± 0,04	0,23 ± 0,12	0,25 ± 0,05	0,26 ± 0,04	n.s.
	R7	0,42 ± 0,07	0,43 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,47 ± 0,06	p < 0,01
FFE Periorbital	CAEC (u.a.)	60,2 ± 8,0	62,7 ± 8,4	64,4 ± 10,2	64,7 ± 9,8	p < 0,01
	TEWL	9,8 ± 3,0	9,2 ± 2,1	8,4 ± 1,9	9,0 ± 2,1	n.s.
	Espessura derme (µm)	1,61 ± 0,25	1,49 ± 0,17	1,50 ± 0,26	1,40 ± 0,16	p < 0,0001
	PBE	14635 ± 4421	12468 ± 3606	10493 ± 3583	9351 ± 2883	p < 0,0001
	PAE	8639 ± 3161	9223 ± 2738	9763 ± 2152	10002 ± 3441	p < 0,1
	Relação de ecogenicidade	0,38 ± 0,14	0,39 ± 0,10	0,47 ± 0,11	0,52 ± 0,13	p < 0,0001
	R2	0,63 ± 0,09	0,64 ± 0,15	0,67 ± 0,12	0,68 ± 0,10	n.s.
	R5	0,59 ± 0,12	0,62 ± 0,11	0,64 ± 0,05	0,64 ± 0,15	n.s.
	R6	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,21 ± 0,04	p < 0,1
	R7	0,50 ± 0,11	0,49 ± 0,08	0,52 ± 0,12	0,53 ± 0,12	n.s.
FFAN Fronte	CAEC (u.a.)	50,1 ± 10,3	51,0 ± 10,0	53,9 ± 9,1	55,7 ± 10,3	p < 0,01
	TEWL	11,6 ± 3,3	10,4 ± 2,2	9,9 ± 2,2	9,5 ± 2,4	p < 0,001
	Espessura derme (µm)	1,63 ± 0,26	1,67 ± 0,24	1,60 ± 0,26	1,60 ± 0,22	p < 0,1
	PBE	18930 ± 3884	15061 ± 4348	12572 ± 4989	14115 ± 5032	p < 0,0001
	PAE	4749 ± 1796	5081 ± 1674	5283 ± 2533	5416 ± 1839	p < 0,01
	Relação de ecogenicidade	0,24 ± 0,08	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,13	0,29 ± 0,09	p < 0,001
	R2	0,63 ± 0,07	0,64 ± 0,18	0,65 ± 0,11	0,69 ± 0,07	p < 0,01
	R5	0,52 ± 0,09	0,54 ± 0,14	0,56 ± 0,12	0,59 ± 0,08	p < 0,01
	R6	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,29 ± 0,23	0,27 ± 0,03	p < 0,1
	R7	0,42 ± 0,04	0,43 ± 0,10	0,46 ± 0,11	0,47 ± 0,09	n.s.
FFAN Periorbital	CAEC (u.a.)	56,7 ± 10,9	57,7 ± 10,3	63,1 ± 9,9	62,5 ± 11,8	p < 0,01
	TEWL	10,0 ± 2,0	10,8 ± 1,5	8,9 ± 2,4	8,9 ± 2,6	p < 0,1
	Espessura derme (µm)	1,52 ± 0,30	1,51 ± 0,20	1,42 ± 0,19	1,42 ± 0,20	p < 0,001
	PBE	13961 ± 5309	12735 ± 3118	10166 ± 3202	10331 ± 4206	p < 0,0001
	PAE	8198 ± 1709	8555 ± 2100	8564 ± 2265	8255 ± 2273	n.s.
	Relação de ecogenicidade	0,39 ± 0,11	0,41 ± 0,09	0,46 ± 0,11	0,47 ± 0,10	p < 0,0001
	R2	0,66 ± 0,09	0,67 ± 0,10	0,68 ± 0,12	0,69 ± 0,10	p < 0,01
	R5	0,61 ± 0,10	0,59 ± 0,16	0,64 ± 0,16	0,66 ± 0,12	p < 0,01
	R6	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,04	p < 0,01
	R7	0,52 ± 0,10	0,52 ± 0,12	0,53 ± 0,13	0,54 ± 0,11	p < 0,01

6.9.1 Avaliação da função de barreira da pele

Uma das principais funções da pele, em que o estrato córneo (EC) assume um papel fundamental, é a proteção contra o meio externo – “função de barreira”. É esta propriedade que evita perdas de água e permite, assim, a manutenção do conteúdo hídrico dos tecidos vivos. No EC a água interage com os agentes de hidratação natural e queratina, sendo responsáveis pela manutenção da elasticidade da pele. Para exercer essa função de forma apropriada e manter a aparência da pele, é importante manter o equilíbrio entre o conteúdo de água do EC e os lipídios da superfície da pele, ou seja o equilíbrio hidrolipídico do EC. No entanto este equilíbrio é rompido por exposição à fatores externos, como: umidade do ar, radiação solar, temperatura e hormônios (NAKAGAWA *et al.*, 2010; AKHTAR *et al.*, 2011).

O Corneometer® e o Tewameter® têm sido os métodos biofísicos mais utilizados para avaliar a função de barreira da pele. O Corneometer® avalia a função de barreira da pele através de medidas do conteúdo aquoso do EC (CAEC); enquanto o Tewameter® permite avaliar a função de barreira da pele através das medidas da perda transepidérmica de água (TEWL). Valores de TEWL representam a perda total de água da epiderme viável e derme, por difusão através do EC para a superfície, originada das glândulas sudoríparas (SOTOODIAN & MAIBACH, 2012; MACHADO *et al.*, 2010). Logo, seus valores se complementam e permitem uma avaliação mais dinâmica do verdadeiro estado de hidratação da pele. Além disso, podem ser utilizados para se determinar o efeito de produtos químicos na função de barreira da pele e no equilíbrio hidrolipídico do EC (GONÇALVES & MAIA CAMPOS, 2009). Quando a integridade da pele está danificada, o TEWL tende a aumentar. Ao passo que a pele saudável tende a apresentar baixos valores de TEWL e altos valores do CAEC (HADGRAFT, 2001). Valores de CAEC podem variar de 0-99, sendo que valores entre 0-30, significa uma pele muito seca; entre 30-60, uma pele seca e de 60-99, uma pele normal.

Os valores do CAEC e TEWL obtidos após 84 dias de uso das formulações fotoprotetoras FFE e FFAN, estão representado nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 21: Conteúdo aquoso do estrato córneo das regiões A) Frontal e B) Periorbital, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE.

Diferença significativa em relação aos valores basais-T0 (*) $p \leq 0.1$, (**) $p \leq 0.01$, teste *t Student*.

Figura 22: Perda transepidérmica de água das regiões A) Frontal e B) Periorbital, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE.

Diferença significativa em relação aos valores basais-T0 (*) $p \leq 0.1$, (***) $p \leq 0.001$, teste *t Student*.

Foi observado que a formulação FFAN promoveu aumento do CAEC e redução do TEWL, de forma significativa, para ambas as regiões estudadas, frontal e periorbital. Enquanto a formulação FFE promoveu aumento significativo do CAES apenas para a região periorbital, e promoveu uma redução significativa do TEWL apenas na região frontal. Logo, podemos sugerir que a formulação FFAN foi mais eficaz em manter a função de barreira da pele. Esta formulação contém diferentes ingredientes ativos em sua composição, além dos filtros solares: *Spirulina* e DMC-NLS. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a *Spirulina*, foi capaz de melhorar o CAEC e o TEWL de voluntárias com pele madura (idade entre 40-65 anos), devido ao seu alto teor em polissacarídeos, promovendo a

regeneração do EC (DELSIN *et al.*, 2015). Resultados semelhantes têm sido obtidos por produtos cosméticos que utilizam extratos de microalgas marinhas (MAIA CAMPOS *et al.*, 2013; MERCURIO *et al.*, 2015).

Ainda, PARDEIKE & MULLER (2007) reportaram que cremes contendo NLS aumentaram a hidratação da pele mais significativamente quando comparado com um creme convencional e região controle. As NLS possuem pequeno tamanho de partícula e maior área de superfície, o que promove a formação de um filme oclusivo sobre a pele, promovendo redução do TEWL e aumento do CAEC, conforme observado neste estudo. A discussão sobre o efeito oclusivo das NLS *in vivo* é um pouco controverso. JENNING *et al.* (2000), por exemplo, não viram diferença significativa nos valores do TEWL quando compararam uma formulação em gel contendo, ou não, NLS à 20% (p/p). Eles atribuíram este resultado ao alto desvio padrão das medidas do TEWL, que poderiam ter mascarado menores efeitos oclusivos nas NLS. Além disso, não tem sido observado efeito adicional das NLS na oclusividade de formulações que já possuem, por si só, alto poder oclusivo (MULLER *et al.*, 2002). Como neste estudo foi utilizado um veículo com baixo conteúdo oleoso, foi possível verificar o efeito oclusivo das NLS desenvolvidas.

Este resultado, foi decorrente da combinação de agentes oclusivos e umectantes presentes nas formulações objeto de estudo, o que promoveu a formação de um filme oclusivo sobre a pele, prevenindo a perda transepidérmica de água e aumentando a retenção de água no EC (DAL'BELO *et al.*, 2006). Logo, pode-se concluir que ambas as formulações foram efetivas em manter a função barreira da pele e não provocaram nenhum desequilíbrio no filme hidrolipídico do EC, uma vez que não promoveram aumento dos valores do TEWL.

6.9.2 Espessura e ecogenicidade da derme

A espessura e a ecogenicidade da derme estão correlacionadas aos danos causados pela radiação solar e fotoenvelhecimento cutâneo e, portanto, têm sido empregados para avaliar a eficácia de formulações anti-idade e fotoprotetoras empregando-se o ultrassom de 20 MHz (GNIADOCKA *et al.*, 1994; CRISAN *et al.*, 2015). Os valores obtidos neste estudo para a espessura da derme (mm), PBE, PAE e relação de ecogenicidade (PAE/pixel total), após aplicação das formulações

fotoprotetoras FFE e FFAN, nas regiões frontal e periorbital, estão ilustrados nas Figuras 23 e 24, respectivamente. Foi observado que a formulação FFE promoveu alteração significativa de todos os parâmetros avaliados após 84 dias de aplicação, em ambas as regiões do estudo (frontal e periorbital). Enquanto a FFAN, para a região frontal, promoveu alteração significativa para os parâmetros PBE, PAE e relação de ecogenicidade; e para a região periorbital, foi observada diferença significativa para a espessura da derme, PBE e relação de ecogenicidade.

Figura 23: Valores obtidos para A) Espessura da derme, B) PBE, C) PAE e D) Relação de ecogenicidade, determinados na região frontal das voluntárias, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=22).

Diferença significativa em relação aos valores basais-T0 (*) $p \leq 0,1$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$, (****) $p \leq 0,0001$, teste t de Student para amostras pareadas.

Figura 24: Valores obtidos para A) Espessura da derme, B) PBE, C) PAE e D) Relação de ecogenicidade, determinados na região periorbital das voluntárias, após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=22).

Diferença significativa em relação aos valores basais-T0 (*) $p \leq 0,1$, (***) $p \leq 0,001$, (****) $p \leq 0,0001$, teste de Wilcoxon.

A relação de ecogenicidade da derme permite avaliar a densidade e integridade da matriz extracelular da derme, que varia de acordo com a idade, exposição à radiação solar e tratamentos dermatocósméticos (*peeling*, laser, entre outros), conforme pode ser visualizado na Figura 25A e C (CRISAN *et al.*, 2015). Considerando que a ecogenicidade da pele será maior quanto maior o número de PAE e da relação de ecogenicidade, podemos concluir que, ambas as formulações melhoraram a ecogenicidade da pele. No entanto, FFAN apresentou resultados um pouco melhores após aplicação na região frontal (onde se tem maior aplicação do produto comparado com a região periorbital), sugerindo que a incorporação de AO na formulação ofereceu proteção adicional contra os danos da radiação solar a nível da derme. Resultados similares foram observados DELSIN *et al.* (2015), onde a *Spirulina*, presente na formulação FFAN, aumentou significativamente a relação de

ecogenicidade da pele madura (idade entre 40-65 anos). Neste estudo, além desta microalga, tem-se o DMC-NLS, potencializando o poder antioxidante da formulação. Na Figura 25, podemos verificar uma melhora visível na ecogenicidade da pele após aplicação da formulação FFAN, em uma pele jovem e madura.

Figura 25: Imagem bidimensional da região frontal de uma mesma voluntária A) e B) com 50 anos e C e D) com 34 anos, após 0 (T0) e 84 (T84) dias de aplicação da formulação FFAN, obtidas com auxílio do Ultrassom 20-MHz.

Escala de ecogenicidade: branco > vermelho > amarelo > verde > azul > preto.

Tem sido relatado que regiões pouco ecogênicas na derme estão relacionadas a degradação das fibras de colágeno, ocorrência de processos inflamatórios, elastose solar, acúmulo de água e glicosaminoglicanas na derme. A elastose solar é uma característica histológica marcante na pele fotoenvelhecida. Neste caso, devido exposição à radiação solar, ocorre aumento da elastina, que apresenta aspecto irregular, com deformações e funcionalidade prejudicada, decorrente dos processos inflamatórios; e que, neste caso, parece ocupar as áreas previamente ocupadas

pelas fibras de colágeno, degradadas pela radiação solar (GNIADÉCKA *et al.*, 1994; MERCURIO *et al.*, 2016). Em um estudo que avaliou a pele fotoenvelhecida, HOFFMAN *et al.* (1994) demonstraram que a pele exposta ao sol apresenta uma zona escura de baixa ecogenicidade, comparada com peles com pouca exposição solar, corroborando com os resultados observados no presente estudo. Além disso, foi verificado que o uso frequente do protetor solar, contendo ou não AO, impediu que a radiação solar atingisse as camadas mais profundas da pele, evitando os danos citados anteriormente, uma vez que foi observado aumento da ecogenicidade da pele. O protetor solar contendo AO apresentou efeito um pouco mais pronunciado.

Estudos anteriores na literatura demonstraram, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, um aumento da eficácia fotoprotetora na região UV após associação de filtros UV e AO, devido à redução da expressão das metaloproteinases de matriz, de mediadores de processos inflamatórios, bem como da depleção das células de Langerhan's (MATSUI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

Além disso, sabe-se que a radiação solar induz queratinização da epiderme e espessamento da derme após exposição prolongada, como uma proteção natural do organismo aos danos causados pela radiação solar (MERCURIO *et al.*, 2016). Desta forma, o aumento na espessura da derme é uma forma de quantificar os danos causados pelo sol. Neste estudo, foi verificado redução significativa da espessura da derme após aplicação de ambas as formulações, em ambas as regiões avaliadas, sugerindo que as formulações foram eficazes em proteger a pele contra os danos causados pela exposição solar.

6.9.3 Propriedades mecânicas da pele

As propriedades mecânicas da pele, elasticidade e plasticidade, estão correlacionadas com a idade, sexo e região anatômica e refletem as propriedades viscoelásticas da pele, determinadas pela epiderme e derme. Além disso, desempenham um papel fundamental na manutenção das características normais da pele, incluindo aparência, função de barreira, regulação da temperatura e de funções imunológicas (EZURE *et al.*, 2016; MIN *et al.*, 2016). Desta forma, qualquer alteração nas propriedades biomecânicas ou na estrutura organizacional da pele,

incluindo o estrato córneo (e seu conteúdo lipídico, teor de água e substâncias hidrossolúveis e queratina), nas fibras de colágeno e elastina da camada dérmica, as glicosaminoglicanas e a viscosidade do fluido intersticial, são manifestadas como alterações nas propriedades mecânicas da pele (DOBREV, 2000; MIN *et al.*, 2016). Conforme discutido anteriormente, um dos principais danos causados pela exposição à radiação solar, especialmente a radiação UVA, é a degradação das fibras de colágeno localizadas na derme, levando à uma perda de elasticidade e firmeza da pele (DUPONT *et al.*, 2013; EZURE *et al.*, 2016).

Os parâmetros obtidos com o Cutometer® podem ser divididos em parâmetros absolutos e relativos. Os parâmetros absolutos, U_e , U_f , U_v , U_r e U_a , estão correlacionados com a espessura da pele, e os parâmetros relativos, U_a/U_f (R2), U_r/U_e (R5), U_v/U_e (R6) e U_r/U_f (R7), são independentes da espessura da pele e podem ser usados para comparação entre sujeitos, região anatômica e tempos diferentes (DOBREV, 2000). De forma que, quanto mais próximo de um (1) estes parâmetros estiverem, maior será a elasticidade da pele. Desta forma, devido a variações biológicas entre as voluntárias e diferentes tempos de estudo (T0, T28, T56 e T84), foram utilizados apenas os parâmetros relativos para comparar as propriedades mecânicas da pele antes e após aplicação das formulações objeto de estudo.

Os valores obtidos para estes parâmetros, medidos na região frontal e periorbital, estão ilustrados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Para ambas as regiões, foi observado que todos os parâmetros aumentaram após aplicação de ambas as formulações avaliadas. Mas a formulação FFAN promoveu uma melhora muito mais significativa comparada com a formulação FFE para todos os parâmetros avaliados, exceto R7, da região frontal. Na região periorbital, a formulação FFE também promoveu aumento de todos os parâmetros, mas foi significativo apenas para R6, ao contrário de FFAN, que promoveu aumento significativo para todos os parâmetros avaliados.

Figura 26: Valores obtidos para A) R2, B) R5, C) R6 e D) R7, determinados na região frontal das voluntárias após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=21).

Diferença significativa em relação aos valores basais-T0 (*) $p \leq 0.1$, (**) $p \leq 0.01$, teste de Wilcoxon.

R2 não está relacionado apenas com o estiramento das fibras de colágeno e elastina da derme, mas também com o movimento do fluido intersticial entre a rede das fibras (MIN *et al.*, 2016). R2 juntamente com R7 são os principais parâmetros usados para avaliar a elasticidade da pele e o envelhecimento. Como este parâmetro aumentou significativamente após aplicação de FFE e FFAN (frontal) e FFAN (periorbital), podemos concluir que houve um aumento na elasticidade bruta da pele nestas regiões após 84 dias de estudo. Por outro lado, R5 avalia a elasticidade líquida da pele e desta forma, está relacionado apenas com elementos como fibras de colágeno e elastina (MIN *et al.*, 2016). Portanto, alterações nos valores de R2 e R5 sugerem menor degradação das fibras de colágeno da derme devido à radiação solar. Neste caso, também foi verificada influência significativa do sistema antioxidante na melhora das condições da pele, uma vez que FFAN promoveu maior aumento dos parâmetros R2 e R5, em ambas as regiões

estudadas, o que corrobora com os resultados encontrados na avaliação da ecogenicidade da pele, item 6.9.2.

Figura 27: Valores obtidos para A) R2, B) R5, C) R6 e D) R7, determinados na região periorbital das voluntárias após 84 dias de aplicação das formulações FFAN e FFE (n=44).

Diferença significativa em relação aos valores basais - T0 (*) $p \leq 0,1$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ teste *t de Student* para amostras pareadas.

R6 representa a porção viscoelástica da deformação sofrida pela pele e é o parâmetro mecânico mais sensível à hidratação da pele (DOBREV, 2000). Ao nível da derme, R6 está relacionado com o movimento do fluido intersticial, que contém glicosaminoglicanas altamente viscosas, através da rede fibrosa da derme. Aumento de R6 indica uma redução na viscosidade deste fluido devido à um aumento no conteúdo de água e alterações na composição e na estrutura das proteoglicanas presentes na derme. O acúmulo de água na derme diminui a fricção entre as fibras e facilita o movimento do fluido intersticial. Na epiderme, o aumento em R6 é atribuído ao amolecimento (“softening”) das camadas da epiderme (principalmente o EC). Portanto, em ambos os casos, está relacionado com a hidratação cutânea, e a água age como um “emoliente” para a derme e epiderme (DOBREV, 2000). Como visto

anteriormente, a formulação FFAN promoveu aumento significativo do conteúdo aquoso do EC, justificando o aumento significativo de R6. Este resultado está de acordo com outros estudos relatados na literatura (AKHTAR *et al.*, 2011; MAZZULLA *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2016). Outros autores afirmam que estes dois parâmetros não possuem uma relação linear, e que a elasticidade da pele não depende apenas da hidratação cutânea (WIECHERS & BARLOW, 1999).

Com relação aos valores de R7, pode-se dizer que está relacionado com a capacidade da pele em recuperar seu estado inicial após deformação e, portanto, tem sido referido como a firmeza da pele (MIN *et al.*, 2016). Desta forma, R7 pode ser relacionado com a espessura da pele, sendo que uma estrutura mais compacta, resulta em uma estrutura da epiderme e derme mais coesa e, portanto, reduzido componente viscoso, melhorando a elasticidade da pele (MERCURIO *et al.*, 2016). Foi observado que a formulação FFE promoveu uma redução significativa da espessura da derme, o que corrobora com os resultados obtidos para o maior valor de R7 em comparação com a formulação FFAN, na região frontal. No entanto, na região periorbital, foi observado aumento significativo de R7 após aplicação de ambas as formulações, FFE e FFAN, uma vez que todas promoveram redução da espessura da derme.

Logo, estes resultados sugerem que os AO incorporados na formulação FFAN, também melhoraram o efeito fotoprotetor oferecido pelos filtros UV, uma vez que foi demonstrado uma melhora significativa nas propriedades mecânicas da pele. Conforme vem sendo discutido ao longo deste trabalho, este resultado pode ser explicado devido a menor formação de radicais livres durante exposição ao sol, quando os AO também estão presentes, corroborando com os resultados discutidos nos itens anteriores.

6.10 Avaliação sensorial da formulação fotoprotetora

Os resultados obtidos para a avaliação sensorial das formulações objeto de estudo estão apresentados na Figura 28. Pode-se observar que não houve diferenças sensoriais entre as formulações FFE e FFAN, sendo que a maioria das voluntárias classificaram a formulação recebida como excelente ou muito boa. Com relação aos efeitos perceptíveis das formulações após 84 dias de aplicação, 53%

das voluntárias que receberam a formulação FFAN, relataram redução nos padrões de hiperpigmentação da face, contra 33% das voluntárias que receberam a formulação FFE. Para os demais efeitos percebidos pelas voluntárias, ambas as formulações apresentaram resultados semelhantes, dentre os quais podemos destacar: aumento da hidratação, pele mais macia e aumento da firmeza da pele, corroborando com os resultados observados no estudo clínico. E 95% das voluntárias, em ambos os grupos de estudo, relataram intenção de compra caso o produto estivesse disponível para comercialização; e nenhuma voluntária apresentou reação alérgica ao produto, assegurando sua segurança pós-aplicação na pele.

Figura 28: Avaliação do sensorial das formulações objeto de estudo de acordo com questionário “*check-all-that-apply*” (CATA), (n=44).

Logo, podemos perceber que a avaliação sensorial é um instrumento importante no desenvolvimento de um produto cosmético e que pode influenciar significativamente no sucesso do produto final. Especificamente para protetores solares, os consumidores buscam produtos que não sejam oleosos e que sejam fáceis de espalhar e rapidamente absorvidos pela pele, conforme o observado para as formulações FFE e FFAN. Estudos anteriores demonstraram que o sensorial dos filtros solares desempenha um papel fundamental na sua eficácia *in vivo*, pois está diretamente relacionada com a quantidade de produto aplicado sobre a pele (COUTEAU *et al.*, 2016, LIU *et al.*, 2012).

7. Conclusão

Com base nos resultados deste estudo podemos concluir que o uso frequente do protetor solar desenvolvido, com FPS 30 e boa proteção UVA, preveniu os danos causados pela exposição ao sol, no que diz respeito à formação radicalar no UV e VIS e, conseqüentemente, melhorou significativamente a função de barreira, a ecogenicidade e as propriedades mecânicas da pele após 84 dias de tratamento. No entanto, a incorporação dos antioxidantes, DMC-NLS e *Spirulina*, na formulação fotoprotetora desenvolvida, foi capaz de reduzir a formação de radicais livres nas regiões UV, VIS e IV do espectro solar, além de ter apresentado melhores resultados para os parâmetros TEWL, conteúdo aquoso do estrato córneo, relação de ecogenicidade, R2, R5 e R6 (relacionados com as propriedades mecânicas da pele). A avaliação sensorial das formulações apresentou boa correlação com as medidas objetivas utilizadas para avaliar o efeito das formulações na pele humana. Por fim, as formulações foram consideradas seguras, uma vez que os filtros solares permaneceram retidos no estrato córneo e não foi observado reação alérgica em nenhuma das voluntárias após 84 dias de tratamento.

É importante salientar que, ao contrário da radiação UVB e UVA, cujos índices de proteção (FPS e FP-UVA) já são bem estabelecidos, os métodos de avaliação da proteção nas regiões do VIS e IV, ainda não são regulamentados e, portanto, torna-se difícil prever qual o grau de proteção oferecido nesta região. Além disso, são necessários mais estudos para comprovar os efeitos das radiações VIS e IV à pele, bem como a real necessidade de fotoproteção nestas regiões. No entanto, as técnicas *in vitro* e *in vivo* empregadas neste estudo permitiram avaliar a eficácia e a segurança destas formulações nas regiões UV, VIS e IV, fornecendo resultados preliminares e complementares, que auxiliam na previsão da proteção oferecida por protetores solares em toda a região do espectro solar, bem como, os efeitos benéficos dos antioxidantes estudados.

8. Referências Bibliográficas

- ADLHART, C.; BASCHONG, W. Surface distribution and depths profiling of particulate organic UV absorbers by Raman imaging and tape stripping. *Int. J. Cosmet. Sci.*, v.33, p.527–534, 2011.
- AGBAI, O.N.; BUSTER, K.; SANCHEZ, M.; HERNANDEZ, C.; KUNDU, R.V.; CHIU, M.; ROBERTS, W.E.; DRAELOS, Z.D.; BHUSHAN, R.; TAYLOR, S.C.; LIM, H.W.. Skin cancer and photoprotection in people of color: a review and recommendations for physicians and the public. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.70, n.4, p.748-62, 2014.
- AKHALAYA, M.Y.; MAKSIMOV, G.V.; RUBIN, A.B.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. *Ageing Res. Rev.*, v.16, p.1–11, 2014.
- AKHTAR, N.; ZAMAN, S.U.; KHAN, B.A.; AMIR, M.N.; EBRAHIMZADEH, M.A. Calendula extract: effects on mechanical parameters of human skin. *Acta Polon. Pharm. - Drug Res.*, v.68, n.5, p.693-701, 2011.
- ASCENCIO, S.M.; CHOE, C.; MEINKE, M.C.; MÜLLER, R.H.; MAKSIMOV, G.V.; WIGGER-ALBERTI, W.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.104, p.51-58, 2016
- ASHTIKAR M, MATTHAUS C, SCHMITT M, KRAFFT C, FAHR A , POPP J. Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.50, p.601-8, 2013.
- ATTAMA, A.A.; MULLER-GOYMANN, C.C.. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.315, p.189–195, 2008.
- BANGALE, M.S.; MITKARE, S.S.; GATTANI, S.G.; SAKARKAR, D.M.. Recent nanotechnological aspects in cosmetics and dermatological preparations. *Int. J. Pharm. Pharmac. Sci.*, v.4, n. 2, 2012.
- BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. (Ed.). Handbook of cosmetic science and technology. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2009. 869 p. ISBN 9781420069631.
- BAROLET, D.; CHRISTIAENS, F.; HAMBLIN, M.R.. Infrared and skin: Friend or foe. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.155, p.78-85, 2016.
- BAROLI, B.. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J. Pharmaceut. Sci.*, v.99, n.1, p.21–50, 2010.
- BENDOVIÁ, H.; AKRMAN, J.; KREJCI, A.; KUBÁČ, L.; JÍROVÁ, D.; KEJLOVÁ, K.; KOLÁROVÁ, H.; BRABEC, M.; MALÝ, M. In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicol. in Vitro*, v.21, p.1268-1275, 2007.
- BOOTS THE CHEMIST LTD. (England), The revised guidelines to the practical measurement of UVA: uvb ratios according to the Boots Star Rating System. Nottingham: The Boots CO PLC; 2004.
- BOSE, S.; DUC, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B.. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *Int. J. Pharm.*, v. 441, p. 56-66, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Brasília, v.1, 52p., 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 69, de 23 de março de 2016. Dispõe sobre o “Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”. Diário Oficial da União, Brasília, 23 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 10 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Fica aprovado as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Diário Oficial da União, Brasília, 01 dez. 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, 04 jun. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança e Eficácia de Produtos Cosméticos. Brasília, ed.2, 74p., 2012c.

BRULS, W.A.G.; SLAPER, H.; VAN DER LEUN, J.C.; BERRENS, L.. Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. **Photochem. Photobiol.**, v. 40. n. 4, p.485-494, 1984.

CAETANO, L.V.; SOARES J.L.; BAGATIN, E.; MIOT, H.A.. Reliable assessment of forearm photoageing by high-frequency ultrasound: a cross-sectional study. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.38, p.170-177, 2016.

CASPERS, P.J.; CASPERS, P.J.; LUCASSEN, G.W.; CARTER, E.A.; BRUINING, H.A.; PUPPELS, G.J. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. **J. Invest. Dermatol.**, v.116, p.434-42, 2001.

CASTRO, G. A.; COELHO, A.L.; OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, G. A.; OREFICE, R. L.; FERREIRA, L. A..Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 381, p. 77–83, 2009.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S.Q.. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 67, p. 1013-1024, 2012.

CHILCOTT, R. P.; FARRAR, R. Biophysical measurements of human forearm skin in vivo: effects of site, gender, chirality and time. **Skin Res. Technol.**, v.6, n.2, p.64-69, 2008.

CHO, S.; SHIN, M.H.; KIM, Y.K.; SEO, J.E.; LEE, Y.M.; PARK, C.H.; CHUNG, J.H.. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. **J. Invest. Dermatol.**, v.14, p.15–19, 2009.

CHOE, C.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E.. Analysis of human and porcine skin in vivo/ex vivo for penetration of selected oils by Confocal Raman microscopy. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v.28, p.318-30, 2015.

CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M. et al.. What is the 'true' function of skin? **Exp. Dermatol.**, v. 11, p. 159–187, 2002.

CLARYS, P.; CLIJSEN, R.; TAEYMANS, J.; BAREL, A.O. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825) and the impedance method (Skincon 200EX). **Skin Res. Tech.**, v.18, n.3, p.316-323, 2012.

COLIPA. Guidelines. In: In vitro UV Protection Method Task Force. In vitro method for the in vitro determination of UVA protection factor and critical wavelength values of sunscreen products, 2011.

COLIPA. Guidelines. In: International Sun Protection Factor (SPF) Test Method, 2006.
CORRÊA, M.A.. Cosmetologia: Ciência e Técnica. Colaboradores: Alberto Keidi Kurebayashi e Vera Lúcia Borges Isaac. 1 ed. São Paulo: Medfarma, 2012. 492 p. ISBN: 8589248097.

CORRÊA M.P., PIRES, L.C.. Doses of erythematous ultraviolet radiation observed in Brazil. **Int. J. Dermatol.**, 2013;52:966-73.

COUTEAU, C., DIARRA, H., COIFFARD, L. Effect of the product type, of the amount of applied sunscreen product and the level of protection in the UVB range on the level of protection achieved in the UVA range. **Int. J. Pharm.**, v.500, n.1-2, p.210-216, 2016.

CRIADO, P.R.; MELO, J.N.; OLIVEIRA, Z.N.P. Topical photoprotection in childhood and adolescence. **J. Pediatr.**, v. 88, n. 3, p. 203-210, 2012.

CRISAN, D.; ROMAN, I.; CRISAN, M.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BADEA, R.. The role of vitamin C in pushing back the boundaries of skin aging: an ultrasonographic approach. Clinical, **Cosm. Invest. Dermatol.**, v.8, p. 463-470, 2015.

DAL'BELO, S. E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques.. **Skin Res. Tech.**, v.12, n.2, p.241-246, 2006.

DARVIN, M.E.; FLUHR, J.W.; MEINKE, M.C.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Exp. Dermatol.**, v.20, p.125–129, 2011.

DARVIN, M.E.; MEINKE, M.C.; STERRY, W.; LADEMANN, J.. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin. **J. Biomed. Opt.**, v.18, n.6, p.61230, 2013.

DELSIN, S.D.; FOSSA, M.M.; MERCÚRIO, D.G.; CAMPOS, P.M.B.G.M.. Clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing Spirulina extract on young and mature skin: effects on the skin hydrolipidic barrier and structural properties. **Clin. Pharmacol. Biopharm.**, v. 04, p. 1, 2015.

DIAVÃO, S. N. C., GABRIEL, K. C. Estudo dos parâmetros físico-químicos na estabilidade de emulsões cosméticas. **Infarma**, v.21, no 11/12, 2009.

- DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.16, n.2, p. 47-52, 1994.
- DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.43, n.6, p.1024-1035, 2000.
- DOBREV, H. Use of cutometer to assess epidermal hydration. *Skin Res. Technol.*, v.6, p.239-244, 2000.
- DRENO, B.; ARAVIISKAIA, E.; BERARDESCA, E.; BIEBER, T.; HAWK, J.; SANCHEZ-VIERA, M.; WOLKENSTEIN, P. The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v.28, n.11, p.1409-1417, 2014.
- DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. Beyond UV radiation: A skin under challenge. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.35, p. 224–232, 2013.
- DURAND, L.; HABRAN, N.; HENSCHER, V.; AMIGHI, K. In vitro evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. *Int. J. Cos. Sci.*, v.31, p.279–292, 2009.
- ELKEEB, R., HUI, X., CHAN, H., TIAN, L., MAIBACH H. I. Properties in vitro : comparison of three evaporimeters. *Skin Res. Technol.*, v.16, p.9–15, 2010.
- ELSNER, P.; FLUHR, J.W.; GEHRING, W.; KERSCHER, M.J.; KRUTMANN, J.; LADEMAN, J.; MAKRANTONAKI, E.; WILHELM, K-P.; ZOUBOULIS, C.C. Anti-aging data and support claims-consensus statement. *JDDG*, v.9, n.s3, p.S1-S32, 2011.
- EZURE, T.; YAGI, E.; AMANO, S.; MATSUZAKI, K.. Dermal anchoring structures: convex matrix structures at the bottom of the dermal layer that contribute to themaintenance of facial skin morphology. *Skin Res. Technol.*, v.22, p.152–157, 2016.
- FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. A. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). *Braz. J. Pharmacog.*, v. 21, n. 4, p.737-743, 2011.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Department of Health, Education and Welfare. USA: Sunscreen drug products for over-the-counter drugs: proposed safety, effective and labeling conditions. Federal register. 43/166, 38206-69, 1978.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Department of Health and Human Services, FDA. USA: Sunscreen Drug Product for Over-The-Counter Human Use, Tentative Final Monograph. Federal Register. 58(90):27693-28194, 1993.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): Department of Health and Human Services (June 17, 2011). "Revised Effectiveness Determination; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use" (PDF). Federal Register 76 (117): 35672–35678, 2011.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): Department of Health and Human Services. FDA Sheds Light on Sunscreens (2016). Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm258416.htm>, acessado em 16 de Junho de 2016, às 13:21 horas.
- FITZPATRICK, T.B.. The validity and practicality of sun-reactive skin type I through VI. *Arch. Dermatol.*, v.124, p.869–871, 1988.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Quím. Nov.**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FREITAS, J.V.; PRAÇA, F.S.G. ; BENTLEY, M.V.L.B. ; GASPAR, L.R. . Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **Int. J. Pharm.**, v.484, p.131-137, 2015.

FREITAS, L.A.P.; ZAMARIOLI, C.M.; MARTINS, R.M. Brazilian Patent Office. INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcuminóides, nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcuminóides e uso das mesmas. Registered patent number: BR1020150090170, 22/04/2015, Brazil.

FUCHS, J.. Potentials and limitations of the natural antioxidants rrr-alpha-tocopherol, l-ascorbic acid and b-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Rad. Biol. Med.**, v.25, n.7, p.848–873, 1998.

GASPAR, L. R.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, n.11, p.3493-3500, 2008.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int. J. Pharma.**, v.250, n.1, p.35-44, 2003.

GIANETI, M.D.; GASPAR, L.R.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.M. Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. **Molecules**, v.17, p.2219-2230, 2012.

GNIADECKA, M.; GNIADECKI, R.; SERUP, J.; SONDERGAARD, J. Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: Diurnal changes and interindividual variability. **J. Invest. Dermatol.**, v.102, p.362–365, 1994.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R.. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxi. Med. Cel. Long.**, v.2014. Article ID 860479, 6 pages, 2014.

GONÇALVES, G.M.S.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.45, n.1, p. 1-10, 2009.

GRETHER-BECK, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; KRUTMANN, J.. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.30, p.167–174, 2014.

HAAG, S.F. et al. Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream. **Eur. J. Pharma. Biopharma.**, v.86, p.227–233, 2014.

HADGRAFT, J. Modulation of the barrier function of the skin. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.14, suppl.1, n.1, p.72-81, 2001.

HAN, A.; CHIEN, A.L.; KANG, S. Photoaging. **Dermatol. Clin.**, v.23, n.3, p.291-299, 2014.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C.. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? **J. Invest. Dermatol.**, vol.121(4), p.862-868, 2003.

- HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J.. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. ***Spectrochimica Acta Part A***, v.63, p.840–845, 2006.
- HERZOG, B.; OSTERWALDER, U.. In silico determination of topical sun protection. ***Cosm. Sci. Technol.***, p.62-70, 2011.
- HEXSEL, C.L.; BANGERT, S.D.; HEBERT, A.A.; LIM, H.W.. Current sunscreens issues: 2007 Food and Drug Administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products. ***J. Am. Acad. Dermatol.***, v.59, p.316-323, 2008.
- HOFFMANN, K. et al.. Assessment of actinic skin damage by 20-MHz sonography. ***Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.***, v.10, p.97–101, 1994.
- INCA. Estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acesso em: 30 de abril de 2016, às 21:45 horas.
- HAQUE, T.; CROWTHER, J.M.; LANE, M.E.; MOORE, D.J. Chemical ultraviolet absorbers topically applied in a skin barrier mimetic formulation remain in the outer stratum corneum of porcine skin. ***Int. J. Pharm. Biopharm.***, v.510, p.250-254, 2016.
- HENG, K.Y.; KEI, T.Y.; SINGH, K.J.; HAIRUI, L.I.; AI-LING, P.O.H.; LIFENG, K. Handbook of Cosmeceutical Excipients and their Safeties. Elsevier Store, Cambridge, UK, 1st Edition, p.163. ISBN 978-1-908818-71-3, 2014.
- JENNING, V.; SCHAFER-KORTING, M.; GOHLA, S.H.. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. ***J. Control. Release***, v.66, n.2, p.115-126, 2000.
- JEON, H. S. et al.. A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: Effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation in vitro and anti-wrinkle effect in vivo. ***Int. J. Pharm.***, v. 452, p. 311- 320, 2013.
- JO, D.H. et al.. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. ***Nanomed. Nanotechnol.***, v.11, p.1603–1611, 2015.
- KANG, K-C.; JEONG, N-H.; LEE, C-I.; PYO, H-B.. Preparation and characterization of SLNs (W/O/W type) contained lipoic acid PEG ester by variation lipid. ***J. Ind. Eng. Chem.***, v.15, p.529–536, 2009.
- KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F.. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. ***Nanomedice: NBM***, v.6, p.753-759, 2010.
- KHURANA, S.; BEDI, P.M.S.; JAIN, N.K.. Preparation and evaluation of solid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. ***Chem. Phys. Lipids***, v.175-176, p.65-72, 2013.
- KHURY, E.; BORGES, E.. Protetores solares. ***Rev. Bras. Med.***, p. 4-18, 2013.
- KIM, J.Y.; SONG, J.Y.; LEE, E.J.; PARK, S.K.. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. ***Colloid. Polym. Sci.***, v.281, p.614-623, 2003.
- KRUTMANN, J.; MORITA, A.; CHUNG, J.H.. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. ***J. Invest. Dermatol.***, v.132, p.976–984, 2012.

- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W.. Photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.52, p.937-58, 2005.
- KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K.. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. *Matirial Sci. Eng. C*, v.33, p.1842-1852, 2013.
- LABOUTA, H.I.; SCHNEIDER, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedic. Nanotechnol. Bio. Med.*, v.9, n.1, p.39-54, 2013.
- LACATUSU, I. et al.. Design of soft lipid nanocarriers based on bioactive vegetable oils with multiple health benefits. *Chem. Eng. J.*, v.246, p.311-321, 2014.
- LACOUR J. P.; BÉANI J. C. Photoprotectino naturelle, photoprotection externe (topique et vestimentaires). *Ann. Dermatol. Venereol.*, v.134, n.5, p.418-434, 2007.
- LEE, C.H.; MOTURI, V.; LEE, Y.. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Control. Release*, v.136, p.88–98, 2009.
- LI, H.; CHENG, K.;WONG,C.; FAN, K.; CHEN, F. JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.*, v.102, p.771-776, 2007.
- LIEBEL, F., KAUR, S., RUVOLO, E., KOLLIAS, N., SOUTHALL, M.D. Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *J. Invest. Dermatol.* 132:1901–1907, 2012.
- LIM, H.D.. Sun exposure and vitamin D level. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.58, p.516, 2008.
- LIPOTEC, S. A.. Lipochroman: skin cell damage prevention by RNS scavenging. Technical dossier, 2005.
- LIU, S.; GUO, C.; WU, D.; XU, P.. Protein indicators for HaCaT cell damage induced by UVB irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.114, p.94–101, 2012.
- LIU, W.; HU, M.; LIU, W.; XUE, C.; XU., H.; YANG, X.. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetate. *Int. J. Pharm.*, v.364, p.135–141, 2008.
- LIU, W., WANG, X., LAI, W., YAN, T., WU, Y., WAN, M., YI, J., MATSUI, M.S. Sunburn protection as a function of sunscreen application thickness differs between high and low SPFs. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v.28, n.3, p.120–126, 2012.
- LOPES, L.B.; VANDEWALL, H.; LI, H.T.; VENUGOPAL, V.; LI, H.K.; NAYDIN, S.; HOSMER, J.; LEVENDUSKY, M. et al. Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity. *J. Pharm. Sci.*, v. 99, n. 3, 2010.
- LUEBBERDING, S.; KRUEGER, N.; KERSCHER, M.. Mechanical properties of human skin in vivo: a comparative evaluation in 300 men and women. *Skin Res. Tech.*, v.20, n.2, p.127-135, 2014.
- MACHADO, M.; HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.32, p.397-409, 2010.

MAHMOUD, B.H.; HEXSEL, C.L.; HAMZAVI, I.H.; LIM, H.W.. Effects of visible light on the skin. **Photochem. Photobiol.**, v.84, p.450-62, 2008.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; CAMARGO, JR.F.B.; CORAUCE, D. Spirulina containing cosmetic composition and cosmetic treatment method. European Patent Office Netherlands patent EP 12768486.8-1458, 2014.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; GIANETI, M.D.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIN, Y.M.; GASPAR, L.R.. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of an association of bioflavonoids with liposoluble vitamins. **Photochem. Photobiol.**, v.82, n.3, p.683-688, 2006.

MALVERN ZETASIZER NANO-ZS. User Instructions. NBTC User Instructions. 2009.

MARESCA, V.; FLORI, E.; PICARDO, M.. Skin phototype: a new perspective. **Pigment. Cell. Melanoma Res.**, v.28; p.378–389, 2015.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F.. Exposure to Non-Extreme Solar UV Daylight: Spectral Characterization, Effects on Skin and Photoprotection. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p.68-90, 2015.

MATSUI, M. S.; HSIA, A.; MILLER, J.D.; HANNEMAN, K.; SCULL, H.; COOPER, K.D.; BARON, E. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 14, p. 56-59, 2009.

MAZZULLA, S.; CARINO, A.; MIANO, A.; MIGNINI, F.; BARTOLOMEI, G.; MARTINO, G.. Analysis of human skin tissue by a skin-meter: A preliminary study. **Open J. Mol. Int. Physiol.**, v.2, p.107-111, 2012.

MEHNERT, W.; MADER, K.. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Adv. Drug Dev. Rev.**, 47, 165-196, 2001.

MEINKE, M.C.; HAAG, S.F.; SCHANZER, S.; GROTH, N.; GERSONDE, I.; LADEMANN, J.. Radical protection by sunscreens in the infrared spectral range. **Photochem. Photobiol.**, v.87, p.452-6, 2011.

MEINKE, M.C.; SYRING, F.; SCHANZER, S.; HAAG, S.F.; GRAF, R.; LOCH, M.; GERSONDE, I.; GROTH, N.; PFLUCKER, F.; LADEMANN, J.. Radical protection by differently composed creams in the UV/VIS and IR spectral ranges. **Photochem. Photobiol.**, v.89, p.1079–1084, 2013.

MERCÚRIO, D.G.; JDID, R.; MORIZOT, F.; MASSON, P.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.. Morphological, structural and biophysical properties of French and Brazilian photoaged skin, **Br. J. Dermatol.**, v. 174(3), p.553-61, 2016.

MERCÚRIO, D.G.; WAGEMAKER, T.A.; ALVES, V.M.; BENEVENUTO, C.G.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M. In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.153, p.121-126, 2015.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M.. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Prog. Mater. Sci.**, v. 57, p. 875–910, 2012.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S.. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Cad. Farm.**, v. 18, n.2, p.81-87, 2002.

- MIN, P.; BENEDETTO, G.; LAZZERI, D.. Alteration of skin mechanical properties in patients undergoing botulinum toxin type a injections of forehead rhytides. **Aesth. Plast. Surg.**, v.40, p.410-420, 2016.
- MONTENEGRO, L.; SINICO, C.; CASTANGIA, I.; CARBONE, C.; PUGLISI, G.. Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: *in vitro* evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 434, p. 169-174, 2012.
- MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A.. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54 (Suppl. 1), p. 131–155, 2002.
- NAKAGAWA, N., MATSUMOTO, M., SAKAI, S. In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy. **Skin Res. Technol.**, v.1, p.137–141, 2010.
- NASH, J. F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatol. Clin.**, v. 24, n. 1, p. 35-51, 2006.
- NATARAJAN, V.T.; GANJU, P.; RAMKUMAR, A.; GROVER, R.; GOKHALE, R.S.. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nat. Chem. Biol.**, v.10, p. 542-551, 2014.
- NESSEEM, D. Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v.33, p.70–79, 2011.
- NEVES, K. Proteção solar. Edição Temática, n. 7, Ano 3, p. 10-35, 2008.
- NYEBORG, M.; PISSAVINI, M.; LEMASSON, Y.; DOUCET, O.. Validation of HPLC method for the simultaneous and quantitative determination of 12 UV-filters in cosmetics. **Int. J. Cosm. Sci.**, v. 32, p.47-53, 2010.
- NOHYNEK, G.J.; LADEMANN, J.; RIBAUD, C.; ROBERTS, M.S.. Gooon the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.37, p.251–277, 2007.
- OSTERWALDER, U.; HERZOG, B. SPF: World Wide Confusion. **Brit. J. Dermatol.**, v.161, n.3, p.13-24, 2009.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **Int. J. Pharm.**, v. 366, p. 170–184, 2009.
- PARDEIKE, J.; MÜLLER, R.H. Coenzyme Q10 loaded NLCs: preparation, occlusion properties and penetration enhancement. **Pharm. Technol. Eur.**, v.19, p.46–49, 2007.
- PARENTE, M. E.; MANZONI, A. V.; ARES, G. External preference mapping of commercial antiaging creams based on consumers' responses to a check-all-apply questions. **J. Sens. Stud.**, v. 26, p. 158-166, 2011.
- PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B.; GREITER, F.; KRAUS, E. W.. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T.B.; EILSEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN K.F.. **Dermatol. Gen. Med.**, v. 4, p.1689-1717, 1993.
- PENSÉ-LHÉRITIER, A.M.. Recent developments in the sensorial assessment of cosmetic products: a review. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.37, n.5, p.465-473, 2015.

- PIAZENA H , KELLEHER DK. Effects of infrared-A irradiation on skin: discrepancies in published data highlight the need for an exact consideration of physical and photobiological laws and appropriate experimental settings. **Photochem. Photobiol.**, v.86, p.687-705, 2010.
- PIÉRARD, G.E. EEMCO Guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 1: Relevance to the structures and ageing of the skin and subcutaneous tissues. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.12, p.352-362, 1999.
- POLEFKA, T.G.; MEYER, T.A.; AGIN, P.P.; BIANCHINI, R.J. Effects of solar radiation on the skin. **J. Cosm. Dermatol.**, v. 11, p. 134–143, 2012.
- POUILLOT,A.; POLLA, L.; TECCHINI, P.; NEEQUAYE, A.; POLLA, A.; POLLA, B.. Natural antioxidants and their effects on the skin. In Nava Dayan & Lambros Kromidas (Ed.), Formulating, Packaging and marketing of Natural Cosmetics products (First Edit.). John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- PRISTA, L.N., BAHIA, M.F.; VILAR, E. Dermofarmácia e Cosmética. (A. N. Farmácias, Ed.). Porto, Gráfica Maiadouro, 1992.
- PUGLIA, C.; DAMIANI, E.; OFFERTA, A.; RIZZA, L.; TIRENDI, G.G.; TARICO, M.S.; CURRERI, S.; BONINA, F.; PERROTTA, R.. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters Characterization, in vitro penetration and photostability studies. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.51, p.211-217, 2014.
- RANDHAWA, M.; SEO, I.; LIEBEL, F.; SOUTHALL, M.D.; KOLLIAS, N.; RUVOLO, E. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. **PLoS ONE**, v.10, n.6, p.1-14, 2015.
- RAZA, K.; SINGH, B.; SINGAL, P.; WADHWA, S.; KATARE, O.P. Systematically optimized biocompatible isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical treatment of acne. **Colloid. Surf. B Biointerf.**, v.105, p.67-74, 2013.
- RAWLINGS, A.V.; HARDING, C.R. Moisturization and skin barrier function. **Dermatol. Ther.**, v.17, suppl.1, p.43-48, 2004.
- RODRIGUES L. EEMCO Guidance to the in vivo Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin Part 2: Instrumentation and Test Modes. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.14, p.52-67, 2001.
- ROUSSELA, L.; GILBERTA, E.; SALMONA, D.; SERREA, C.; GABARDB, B.; HAFTEKA, M.; MAIBACHC, H.I.; PIROTA, F.. Measurement, analyseis and prediction of topical UV filter biovaibility. **Int. J. Pharm.**, v. 478, n.2, p.804-810, 2015.
- SALVADOR, A.; CHISVERT, A.. An environmentally friendly (“green”) reversed-phase liquid chromatography method for UV filters determination in cosmetics. **Anal. Chim. Acta**, v.537, p.15-24, 2005.
- SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.64, n.4, p.748-58, 2011.
- SARGENT, E.V.; TRAVERS, J.B.. Examining the differences in current regulatory processes for sunscreens and proposed safety assessment paradigm. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, (2016), doi: 10.1016/j.yrtph.2016.03.008.
- SCHALKA, S.; REIS, V.M.S.. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **An. Bras. Dermatol.**, v.86, n.3, p.507-15, 2011.

SCHALKA, S.; ADDOR, F.A.S.; AGELUNE, C.M.; PEREIRA, V.M.C.. Sunscreen protection against visible light: a new proposal for Evaluation. **Surg. Cosmet. Dermatol.**, v.3, p.45-52, 2012.

SCHALKA, S.; STEINER, D.; RAVELLI, F.N. et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An. Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 6, s. 1, p.S6-75, 2014.

SCHIEKE, S.M.; SCHROEDER, P.; KRUTMANN, J.. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.19, p.228-34, 2003.

SCHIEKE, S.M.; STEGE, H.; KÜRTE, V.; GRETH-ER-BECK, S.; SIES, H.; KRUTMANN, J.. Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. **J. Invest. Dermatol.**, v.119, p.1323-9, 2002.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY (SCCS). SCCS 1358/10. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Adopted by the SCCS, 22 June, 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2016.

SCHROEDER, P.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E.; STEGE, H.; MARKS, C.; BRUHNKE, S.; KRUTMANN, J. Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. **J. Invest. Dermatol.**, v.128, p.2491–2497, 2008.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.9, p.464-469, 2010.

SHAATH, N.. Sunscreens: regulation and comercial development. 3rd ed. Boca Raton: T&F informa; p. 325. 2005.

SILVA, A.C.; AMARAL, M.H.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.. Solid lipid nanoparticles (SLN) - based hydrogels as potential carriersfor oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. **Colloid. Surf. B: Biointerf.**, 93, 241–248, 2012.

SINGH, S.; KATE, N. B.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 15, p. 73–95, 2005.

SMYRNIOTAKIS, C.G.; ARCHONTAKI, H.A.. Development and validation of a non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in sun care formulations. **J. Chromatog. A**, v.1031, p.319–324, 2004.

SOBANSKA, A.W., PYZOWSKI, J. Quantification of Sunscreen Ethylhexyl Triazone in Topical Skin-Care Products by Normal-Phase TLC/Densitometry. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 807516.

SOTOODIAN, B.; MAIBACH, H.I.. Noninvasive test methods for epidermal barrier function. **Clin. Dermatol.**, v. 30, p. 301-310, 2012.

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H.; GOHLA, S. A novel approach based on lipid nanoparticles (SLN) for topical delivery of a-lipoic acid. **J. Microencap.**, v.22, n.6, p.581-92, 2005.

- SOUTO, E.B.; WISSING, S.A.; BARBOSA, C.M.; MÜLLER, R.H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.*, v.278, n.1, p.71–77, 2004.
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. *Quím. Nov.*, v. XY, p.1-8, 2011.
- STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering. 2nd ed. Freeman Press: Michigan, 1996. 418 p.
- STIEFEL, C.; SCHWACK, W.. Photoprotection in changing times – UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.37, p.2-30, 2015.
- TAVEIRA, S. F. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele, 2009. 142f. Tese (doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; JUNYAPRASERT, V.B.; MÜLLER, R.H.. Cetylpalmitate-based NLC for topical delivery of coenzyme Q10 - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 67, p. 141–148, 2007.
- TONELI, J.T.C.L.; MURR, F.E.X.; PARK, K.J.. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Rev. Bras. Prod. Agro.*, v.7, n.2, p.181-204, 2005.
- TOUITOU, E.; GODIN, B.. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinics Dermatol.*, v.26, p.375–379, 2008.
- UNHOLZER, A.; KORTING, H.C. High-frequency ultrasound in the evaluation of pharmacological effects on the skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, v.15, p.71–84, 2002.
- VAGHASIYA, H.; KUMAR, A.; SAWANT, K.. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur. J. Pharma. Sci.*, v.49, p.311-322, 3013.
- VERVARESOU, A.. Percutaneous absorption of organic sunscreens. *J. Cosm. Dermatol.*, v.5, p.53-57, 2006.
- ZAMARIOLI, C.M.; MARTINS, R.M.; CARVALHO, E.C.; FREITAS, L.A. Nanoparticles containing curcuminoids (*Curcuma longa*): development of topical delivery formulation. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.25, p.53-60, 2015.
- ZHANG, J.; SMITH, E.. Percutaneous Permeation of Betamethasone 17-Valerate Incorporated in Lipid Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, v.100, n.3, p.896-903, 2011.
- ZHU, Y.J.; CHOE, C.S.; AHLBERG, S. et al. Penetration of silver nanoparticles into porcine skin ex vivo using fluorescence lifetime imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.*, v.20, n.5, p.051006, 2015.
- ZASTROW, L.; GROTH, N.; KLEIN, F.; KOCKOTT, D.; LADEMANN, J.; FERRERO, L. UV, visible and infrared light: which wavelengths produce oxidative stress in human skin? *Hautarzt*, v.60, p.310–317, 2009.

ZITTERMANN, A.; GUMMERT, J.F.. Sun, vitamin D, and cardiovascular disease. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.101, p.124–129, 2010.

ZORODDU, M.A.; MEDICI, S.; LEDDA, A.; NURCHI, V.M.; LACHOWICZ, J.I.; PEANA, M. Toxicity of nanoparticles. *Curr. Med. Chem.*, v.21, n.33, p.3837-53, 2014.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U.. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatol. Ther.*, v.23, n.1, p.31-47, 2010.

WIECHERS, J.W.; BARLOW, T.. Skin moisturization and elasticity originate from at least two different mechanisms. *Int. J. Cosm. Sci.*, v.21, p.425-435, 1999.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H.. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. *Int. J. Cos. Sci.*, v.23, n.4, p.233-243, 2001.

WU, Y.; MATSUI, M.S.; CHEN, J.Z.; JIN, X.; SHU, C.M.; JIN, G.Y.; DONG, G.H.; WANG, Y.K.; GAO, X.H.; CHEN, H.D.; LI, Y.H. Antioxidants add protection to a broad-spectrum sunscreen. *Clin. Exp. Dermatol.*, v. 36, p.178-187, 2011.

ANEXO I - PROTOCOLO CEP-FCFRP Nº. 315

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 060/2013
kms

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2013.

À pós-graduanda

Carla Souza

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia M. B. G. Maia Campos
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 123^a reunião ordinária realizada em 29/11/2013, o projeto de pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE FOTOPROTETORES CONTENDO NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 315.

Informamos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP