UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A

Carolina Gomes Benevenuto

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 30/08/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado(a): Carolina Gomes Benevenuto

Orientador(a): Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Ribeirão Preto

2012

BENEVENUTO,
C.G.
Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A
MESTRADO
FCFRPUSP
2012

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.

Benevenuto, Carolina Gomes
Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A. Ribeirão Preto, 2012.
108p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar

1. Filtros Solares. 2. Vitamina A. 3. Fotoestabilidade.4. Fototoxicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Carolina Gomes Benevenuto
Título: Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

A **Deus**, o Maravilhoso Conselheiro, Deus Forte, Pai da Eternidade e Príncipe da Paz.

"Se, porém, algum de vós necessita de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá liberalmente e nada lhes impropera; e ser-lhe-á concedida". Tiago 1:5

Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Provérbios 2:6

É desígnio de Deus que os homens estejam em constante progresso, alcançando cada dia um ponto mais alto na escala da excelência. Ellen G. White – O Lar Adventista.

Aos meus pais, **Aparecido** e **Bárbara**, pelo interminável amor, compreensão, apoio, carinho e exemplo de cristianismo e de bondade. *"Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.". A.Saint-Exupèry*

Ao meu irmão **Rodolfo**, que além de irmão é um grande amigo; e pelo seu exemplo de determinação e perseverança. *"O que quer dizer cativar? É uma coisa muito esquecida... Significa laços.". A. Saint-Exupéry*

Aos meus avós, **vovó Enez**, **vovô Pedro**, **vovó Antônia** e **vovô Celso**, pelo exemplo do gosto pelo estudo e pelo conhecimento. Pelas sacolinhas de doces, pelas sacolinhas de frutas e pelos pudins de leite. *"Se tu vens às quatro da tarde, desde às três eu começarei a ser feliz". A. Saint-Exupèry*

A toda minha **família**, que mesmo distante sempre foi sempre muito importante. *"As estrelas são belas por causa de uma flor que não se pode ver..." A. Saint-Exupèry*

Ao meu namorado **Eduardo**, por seu apoio, companheirismo e cumplicidade; por seu exemplo de determinação e esforço. *"Tu não és para mim senão uma pessoa inteiramente igual a cem mil outras pessoas. E eu não tenho necessidade de ti. E tu não tens necessidade de mim. Mas, se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás pra mim o único no mundo. E eu serei para ti a única no mundo..." A. Saint-Exupéry.* Também a toda a sua **família**, pelo carinho e apoio em todas as horas.

Às **Marias** e aos **Pedros**, que sempre me alegravam e ensinavam. "*As pessoas grandes não compreendem nada sozinhas, e é cansativo para as crianças estar a toda hora explicando." A. Saint-Exupéry*

Aos **amigos** de Ribeirão Preto, de Artur Nogueira e da Faculdade, pela amizade, companhia, risadas e pelo carinho. *"Mas eu não estava seguro. Lembrava-me da raposa. A gente corre risco de chorar um pouco quando se deixou cativar..."A. Saint-Exupéry*

A todos os **professores** que sabem deixar "o gostinho da ciência". *"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que tu cativas." A. Saint-Exupéry*

A todas as **crianças** que sonham em ser cientistas. *"É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas, dizem que são tão lindas". A. Saint-Exupéry*

Agradecimento Especial

À minha orientadora, Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, por sua incansável determinação, perseverança, dedicação, solicitude e por sua amizade e apoio em todas as horas. "Mas eu não tenho muito tempo… Tenho amigos a descobrir e muitas coisas a conhecer." A. Saint-Exupéry.

Agradecimentos

Às amigas **Nathália** e **Renata**, pela companhia e amizade, pelo grande exemplo de dedicação, determinação e excelência. Ao amigo **David** pelo apoio e entusiasmo na pesquisa e pela amizade.

Às amigas do Tecnoprot, **Juliana**, **Bianca**, pela sincera amizade, pelo apoio e eficiência em todas as atividades.

Aos amigos do NEATEC, **Tais**, **Mirela**, **Nelson** (*in memorian*)**, Daiane**, **Jirrah, Ana Flora**, **Josiane, Marcella,** por todo apoio na pesquisa e pela amizade.

À pós-graduanda **Daiana** por sua solicitude em todas as horas.

A todo o grupo do **Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos** (**NPPNS),** especialmente ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, que gentilmente cedeu o Cromatógrafo para a realização da pesquisa.

À **Profa. Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal,** por toda a sua disponibilidade e gentileza em ceder seus equipamentos e laboratório para a realização de parte dos experimentos com células.

A todos os Professores que, de alguma forma, foram muito gentis e solícitos e cederam algum equipamento para a realização deste trabalho, ou que em algum momento ofereceram alguma sugestão sobre a pesquisa.

Às avaliadoras **Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, Dra. Fabiana** e **Dra. Franciane**, pelas correções e sugestões feitas a este trabalho durante o Exame de Qualificação.

À **Profa. Dra. Pierina Suely Bonato**, pelo exemplo de dedicação e determinação e pela orientação no Programa PAE.

À querida **Ana Cristina**, por todo o apoio, colaboração e solicitude sempre disponível nos experimentos e fora deles; e a todo o grupo da Bioquímica, sempre tão gentis e solícitos.

Aos técnicos **Karina**, **Mariana**, **Perpétua, Patrícia, Mércia, Sônia** e a todos que, de alguma forma, ajudaram na realização desse trabalho.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Rosana dos Santos Florêncio**, e **Eleni Angeli Passos**, por toda a ajuda a realização deste trabalho.

A todos os **professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a minha formação.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos os que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, à **CAPES** e à **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”.

Albert Einstein

RESUMO

BENEVENUTO, C. G. **Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A.** 2012. 108f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Em função da preocupação com a saúde do consumidor, a maioria das formulações cosméticas tem sido acrescida de filtros solares e substâncias ativas antioxidantes, tais como vitaminas, para a proteção dos danos causados na pele pelos raios solares, entretanto, o uso de associações fotoinstáveis pode levar à formação de intermediários reativos que podem promover dermatites de contato e reações fototóxicas na pele, o que leva à necessidade da comprovação da segurança desses produtos frente a exposição à radiação solar. Há um grande empenho da comunidade científica para a utilização de testes alternativos ao uso de animais de experimentação sendo que o teste de fototoxicidade 3T3 NRU PT, em cultura de fibroblastos tem sido o preconizado para a essa finalidade. Assim, o objetivo deste projeto foi a avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares e estabilizadores de filtros solares, associados ao retinol e ao palmitato de retinila, por meio do uso de CLAE e cultura de fibroblastos, respectivamente. Para tal, foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras contendo diferentes filtros solares que foram acrescidas ou não de retinol ou de palmitato de retinila, e de estabilizadores de filtros solares, que são utilizados para melhorar a sua fotoestabilidade. Nesse estudo, amostras das formulações foram aplicadas em lâminas de vidro e expostas à radiação UVA/UVB, a seguir, foram realizadas análises por CLAE, para dosagem do teor de filtros solares e vitaminas, e foi realizado estudo de espectrofotometria no UV, em que foi determinada a razão da absorção na faixa UVA/UVB. A fototoxicidade das associações de filtros solares, estabilizadores e vitaminas foi avaliada por meio do uso de cultura de fibroblastos 3T3, que foi submetida à radiação UVA para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência da radiação. Os resultados obtidos nos sugerem que, no estudo por CLAE, bemotrizinol foi considerado o melhor estabilizador para ambas as vitaminas. No estudo por espectrofotometria no UV, as formulações contendo avobenzona / vitaminas foram consideradas fotoinstáveis, e apenas o bemotrizinol aumentou a fotoestabilidade da avobenzona associada a ambas as vitaminas. No estudo de fototoxicidade, a avobenzona, o dietilexilnaftalato e o retinol apresentaram potencial fototóxico. As associações que continham avobenzona / palmitato de retinila e avobenzona / retinol foram consideradas fototóxicas. A presença do estabilizador dietilexilnaftalato reduziu o potencial fototóxico das associações avobenzona / vitaminas e a presença do estabilizador bemotrizinol reduziu o potencial fototóxico da associação avobenzona / palmitato de retinila. Os resultados encontrados no presente estudo são promissores uma vez que algumas associações consideradas fotoestáveis apresentaram potencial fototóxico, mostrando a importância da realização de ambos os estudos no desenvolvimento / avaliação de formulações fotoprotetoras estáveis e seguras ao uso.

Palavras-chave: Filtros Solares, Vitamina A, Fotoestabilidade, Fototoxicidade.

ABSTRACT

BENEVENUTO, C. G. **Evaluation of photostability and phototoxicity of sunscreen formulations containing a combination of UV-filters and vitamin A**. 2012. 108f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Due to consumer health concern, many cosmetic formulations has been supplemented by UV-filters and antioxidants such as vitamins, for the protection of UV-induced skin damages; however, the use of photounstable combinations can lead to the formation of reactive intermediates which may induce contact dermatitis and phototoxic reactions in the skin, which leads to the necessity of proving the safety of these products before exposure to solar radiation. There is a great effort by the scientific community to promote the alternatives to animal testing, whereas the 3T3 NRU phototoxicity test in cultured fibroblasts has been validated and recommended for this purpose. The objective of this project was to evaluate the photostability and phototoxicity of sunscreen formulations containing different combinations of photostabilizers and UV-filters, combined with retinol and retinyl palmitate, by using HPLC and fibroblast cultures, respectively. For this purpose, sunscreen formulations developed with different UV-filters were added or not of retinol or retinyl palmitate, and photostabilizers, which are used to improve the photostability. Firstly, samples of the formulations were applied on glass slides and exposed to UVA / UVB radiation, then, they were analyzed by HPLC, to determine the concentration of UV-filters and vitamins, and by UV spectrophotometry, to determine the UVA / UVB absorption ratio. Phototoxicity of combinations of UV-filters, photostabilizers and vitamins was evaluated by using the 3T3 fibroblast cultures, which was exposed to UV radiation for the determination of cell viability in the presence and absence of radiation. The obtained results suggested that, in the HPLC study, bemotrizinol was considered the best photostabilizer for both vitamins. In the UV spectrophotometry study, formulations containing avobenzone / vitamins were considered photounstable, and only bemotrizinol increased photostability of avobenzone combined with both vitamins. In the phototoxicity study, avobenzone, diethylhexylnaphthalate and retinol showed phototoxic potential. The combinations containing avobenzone / retinyl palmitate and avobenzone / retinol were considered phototoxic. The presence of the stabilizer diethylhexylnaphthalate reduced the phototoxic potential of avobenzone / vitamins combinations and the presence of bemotrizinol reduces the phototoxic potencial of avobenzone / retinyl palmitate combination. The results of the present study are promissory since some combinations that were considered photostable presented phototoxic potential, showing the importance of performing both studies in the development / evaluation of stable and safe sunscreen formulations.

Keywords: Sunscreens, Vitamin A, Photostability, Phototoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro eletromagnético. 07

Figura 2: Intervalo de eficácia para diferentes classes de filtros solares orgânicos. 12

Figura 3: Mecanismo de deslocalização dos aminobenzoatos. 12

Figura 4: Mecanismo de deslocalização eletrônica dos salicilatos. 13

Figura 5: Mecanismo de deslocalização eletrônica dos cinamatos. 13

Figura 6: Mecanismo de deslocalização eletrônica das benzofenonas. 14

Figura 7: Fotoisomerização dos derivados de cânfora. 15

Figura 8: Benzotriazolil dodecil p-cresol. 15

Figura 9: Octocrileno. 16

Figura 10: Estrutura molecular da avobenzona. 16

Figura 11: Espectro de absorção da avobenzona. 17

Figura 12: Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona. A e B: tautômeros *cis*-enol. 18

Figura 13: Diferentes Processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona. 19

Figura 14: Diagrama de Jablonski mostrando a excitação das moléculas orgânicas por fótons e suas vias desativação. Abreviações: IC: Conversão Interna; ISC: Cruzamento intersistemas; S0: Estado Fundamental; S0*: Estado Fundamental com energia vibracional; S1: Primeiro estado excitado Singleto; T1: Estado excitado tripleto. 20

Figura 15: Metabolismo da vitamina A no organismo. 23

Figura 16. Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade. CNT = Controle não tratado (contendo células, porém sem nenhuma substância teste); b = branco, contendo DPBS (não contém células, porém tratada com meio vermelho neutro e solução de dessorção). 41

Figura 17. Cromatogramas dos padrões de todas as substâncias analisadas. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (5 µm) 25 cm, detecção: UV 325 nm, temperatura ambiente, fluxo 0,8 $mL.min^{-1}$. Substâncias identificadas: **A:** benzofenona-3 (BZF-3); **B:** octocrileno (OCT), **C:** metoxicinamato de etil-hexila (MTX); **D:** avobenzona (AVO), **E:** Retinol (RET), **F:** dietilexilnaftalato (DEEN); **G:** palmitato de Retinila (PR); **H:** bemotrizinol (BMTZ). 46

Figura 18. Cromatogramas: **A:** Cromatogramas dos padrões de todos os filtros solares e vitaminas analisados. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (5 µm) 25 cm, detecção: UV 325 nm, temperatura ambiente, fluxo 0,8 $mL.min^{-1}$. Picos: benzofenona – 3 (BZF-3), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), retinol (RET), dietilexilnaftalato (DEEN), palmitato de retinila (PR), bemotrizinol (BTZ). **B:** branco de reagente. **C:** veículo. 47

Figura 19: Curva analítica da benzofenona-3 49

Figura 20: Curva analítica do octocrileno 49

Figura 21: Curva analítica do metoxicinamato de etil-hexila 50

Figura 22: Curva analítica da avobenzona 50

Figura 23: Curva analítica do retinol 51

Figura 24: Curva analítica do dietilexilnaftalato 51

Figura 25: Curva analítica do palmitato de retinila 52

Figura 26: Curva analítica do bemotrizinol 52

Figura 27: Cromatogramas da formulação F5Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 62

Figura 28: Cromatogramas da formulação F6Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, benzotriazolil dodecil p-cresol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 63

Figura 29: Cromatogramas da formulação F7Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, dietilexilnaftalato e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 64

Figura 30: Cromatogramas da formulação F8Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, bemotrizinol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 65

Figura 31: Cromatogramas da formulação F5Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 66

Figura 32: Cromatogramas da formulação F6Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, benzotriazolil dodecil p-cresol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 67

Figura 33: Cromatogramas da formulação F7Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, dietilexilnaftalato e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 68

Figura 34: Cromatogramas da formulação F8Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, bemotrizinol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**). 69

Figura 35 – Concentração remanescente dos filtros solares analisados presentes nas formulações em estudo quando submetidas radiação UVA/UVB. **A:** benzofenona-3; **B:** octocrileno; **C:** metoxicinamato de etil-hexila. 70

Figura 36 – Concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas analisados presentes nas formulações em estudo quando submetidas à radiação UVA/UVB. **A:** AVO: avobenzona; **B:** RET: retinol; **C:** PR: palmitato de Retinila. ◆= 71

estatisticamente maior que F1Pr ou F1Ret, ●= estatisticamente maior que F5Ret.

Figura 37. Razão da integral do espectro de absorção UVA/UVB das associações de filtros e estabilizadores, quando submetidas ou não à irradiação durante 15 minutos. 77

Figura 38. Razão da integral do espectro de absorção UVA/UVB das associações de filtros e estabilizadores, contendo palmitato de retinila (PR) ou retinol (RET), quando submetidas ou não à irradiação durante 15 minutos. 78

Figura 39 - Curvas dose-resposta dos filtros em estudos, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0). 81

Figura 40 - Curvas dose-resposta das vitaminas em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0). 82

Figura 41 - Curvas dose-resposta dos estabilizadores em estudo classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0). 82

Figura 42 - Curvas dose-resposta das associações contendo benzofenona-3, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0). 86

Figura 43 - Curvas dose-resposta das associações contendo avobenzona, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0). 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações 35

Tabela 2: Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio. BZF-3: benzofenona-3; OCT: octocrileno; MTX: metoxicinamato de etil-hexila; AVO: avobenzona; RET: retinol; DEEN: dietilexilnaftalato; PR: palmitato de retinila; BMTZ: bemotrizinol. 53

Tabela 3: Concentração remanescente da benzofenona-3 54

Tabela 4: Concentração remanescente do octocrileno 55

Tabela 5: Concentração remanescente do metoxicinamato de etil-hexila 57

Tabela 6: Concentração remanescente de avobenzona 59

Tabela 7: Concentração remanescente de retinol 60

Tabela 8: Concentração remanescente de palmitato de retinila 61

Tabela 9 - Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA, UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação. 73

Tabela 10. Sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA 79

Tabela 11. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N = 2) 80

Tabela 12. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo contendo Benzofenona-3 em cultura de fibroblastos (N = 2) 84

Tabela 13. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo contendo avobenzona, em cultura de fibroblastos. (N = 2) 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus célcius
µg/mL	Microgramas/mililitros
µl	Microlitros
3T3 NRU PT	Teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
A_n	Associação
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVO	Avobenzona
AVO^E	Avobenzona na forma enólica
AVO^K	Avobenzona na forma cetona
b	Branco
BMDBM	Butil metoxidibenzoilmetano
BMTZ	Bemotrizinol
BTDC	Benzotriazolil dodecil p-cresol
BZF-3	Benzofenona-3
C	Concentração
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Cemtímetro
CNT	Controle não tratado
COLIPA	*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DEc	Efeito Dose
DEEN	Dietilexilnaftalato
dm	Decímetro
DME	Dose mínima eritematosa
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMEnp	Dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida

DMEp	Dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar
DMP	Dose mínima pigmentária
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dPBS	*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
EC50	Concentração de uma substância que inibe 50% da viabilidade celular
EROS	Espécies reativas do oxigênio
EWG	*Enviromental Working Group*
FDA	*Food and Drug Administration*
F_n	Formulação
FPS	Fator de proteção solar
h	Hora
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	*International Nomenclature of Cosmetics Ingredients*
INN	*International Nonproprietary Names*
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
J	Joule
min	Minutos
ml	Mililitros
mol	Mol
MPE	*Mean photo effect*
MTX	Metoxicinamato de etil-hexila
mW	Miliwatts
ND	Não determinável
nm	Nanômetros
OCT	Octocrileno
OECD	*Organisation for economic co-operation and development*
OMS	Organização Mundial da Saúde

PABA	Ácido *para*-aminobenzóico
PEci	Foto efeito
PIF	*Photo irritation factor*
PM	Peso molecular
PPD	*Persistent pigment darkening*
PR	Palmitato de retinila
Rc	Resposta
REc	Efeito resposta
RET	Retinol
RNA	Ácido ribonucléico
S0	Estado fundamental eletrônico
S0*	Estado fundamental com energia vibracional
S1	Primeiro estado excitado eletrônico
T1	Estado excitado tripleto
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Volume/volume
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

$\overline{X}$	Média
CV	Coeficiente de Variância
E	Isômero TRANS
E	Exatidão
f	Frequência
n°	Número
S	Desvio padrão
Z	Isômero CIS
ε	Coeficiente de absortividade molar
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de Figuras iii
Lista de Tabelas vi
Lista de Abreviaturas e Siglas vii
Lista de Símbolos x

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 6
2.1. A Radiação UV e a Pele 7
2.2. Filtros Solares e a Fotoproteção 10
2.3 Fotoestabilidade e Estabilizadores de Filtros solares 19
2.4. Vitamina A em cosméticos 21
2.5 Avaliação da performance de fotoprotetores 24
2.5.1 Eficácia 24
2.5.2. Segurança - Fototoxicidade 26
2.5.3. Estabilidade 27

3. OBJETIVOS 29

4. MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1. Materiais 32
4.1.1. Matérias-primas e reagentes 32
4.1.2. Equipamentos e acessórios 33
4.2. Métodos 34
4.2.1. Elaboração das formulações 34
4.2.2. Testes preliminares de estabilidade 36
4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores 36
4.2.3.1. Irradiação das formulações 36
4.2.3.2. Procedimento de extração 36
4.2.3.3. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares por CLAE .. 37
4.2.3.3.1. Precisão e Exatidão 37
4.2.3.4. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV 38
4.2.3.5. Análise estatística 38
4.2.4. Avaliação da Fototoxicidade 39
4.2.4.1. Linhagem celular de fibroblastos 3T3 39
4.2.4.2. Fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT) 39

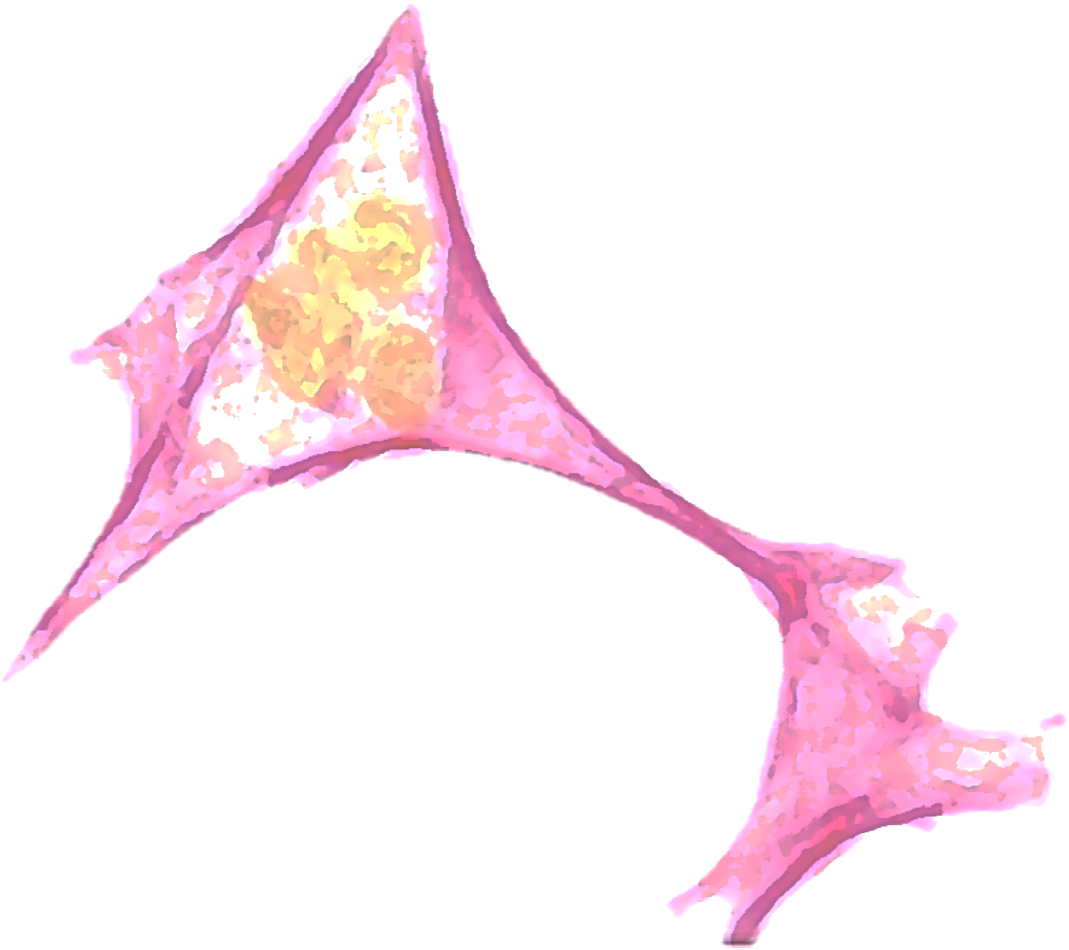
5. RESULTADOS 43
5.1 Testes preliminares de estabilidade 44
5.2. Estudo da fotoestabilidade das formulações 44
5.2.1. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas por CLAE 44
5.2.1.1. Padronização do Método de CLAE 44
5.2.1.2. Irradiação das formulações 48
5.2.1.3. Curvas analíticas 48

5.2.1.4. Precisão e Exatidão 53
5.2.1.5. Determinação da fotoestabilidade das formulações objeto de estudo 53
5.2.2 Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV 72
5.3. Avaliação da Fototoxicidade 78
5.3.1. Análise das Substâncias Isoladas 79
5.3.2. Análise das Associações das Substâncias em Estudo 83

6. DISCUSSÃO 88

7. CONCLUSÃO 96

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98



1. Introdução

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de ambos os cânceres de pele, melanoma e não-melanoma, têm aumentado nas últimas décadas, de forma que, de 2 a 3 milhões de novos casos de câncer de pele não-melanoma e 132.000 casos de melanoma têm ocorrido mundialmente por ano (OMS, 2012). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para 2012 haverá 6.230 novos casos de melanoma e 134.170 casos de não-melanoma.

Já é fato conhecido que o câncer de pele está intimamente relacionado com a exposição da população pela radiação ultravioleta (UV) presente nos raios solares (ARMSTRONG; KRICKER, 2001). A radiação UVB provoca danos ao DNA, hiperplasia da epiderme e inflamação da derme, o que contribui para o desenvolvimento de câncer de pele (BERTON, 2001), já o UVA é claramente um agente mutagênico capaz de produzir mutações em células humanas normais, sendo que deve ser considerado um potencial agente cancerígeno, além de estar relacionado ao fotoenvelhecimento e à diminuição da hidratação e elasticidade da pele (LAVKER, 1995).

Nesse contexto, há uma grande necessidade de formulações com finalidades fotoprotetoras capazes de oferecer proteção eficaz contra a radiação UV. Porém, muitos aspectos devem ser considerados sendo que um deles é o uso de associações de filtros solares que proporcionem uma alta e ampla proteção contra a radiação UV, sem que para isto seja necessário o uso de filtros solares em altas concentrações, o que aumentaria o risco de possíveis reações alérgicas no consumidor; para isto o formulador tem a sua disposição matérias-primas que podem potencializar a eficácia de fotoprotetores.

Outro fator muito importante a ser considerado é a fotoestabilidade, ou seja, os fotoprotetores devem ainda conter uma associação de filtros solares fotoestável, para garantir a sua eficácia, ou seja, uma proteção contra a radiação UVA e UVB, durante todo o período de exposição. Uma associação de filtros solares fotoinstável pode, além de aumentar a exposição à radiação UVA, levar à formação de intermediários reativos que, em contato com a pele, podem ser absorvidos e promover dermatites de contato (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; TARRAS-WAHLBERG et al., 1999; CHATELAIN; GABARD, 2001; CAMBON et al., 2001) bem como eventos genotóxicos e o fotoenvelhecimento (MARROT et al., 2004).

Entretanto, apesar dos formuladores contarem com um grande número de filtros solares UVB, há poucos filtros solares UVA disponíveis no mercado, sendo que a avobenzona, também conhecida como butil metoxidibenzoilmetano, tem sido o mais utilizado. A avobenzona possui uma grande absorção na faixa de 340 a 350 nm, sendo que, frente à exposição ao UV, essa substância apresenta redução dessa absorção devido a reações

de tautomerização, fragmentação e formação de fotoprodutos, o que resulta em uma perda de seu efeito protetor frente ao UVA (DAMIANI et al., 2006; PARIS et al., 2008; SCHWACK; RUDOLPH, 1995).

Assim, torna-se difícil a obtenção de fotoprotetores de amplo espectro de proteção contra a radiação solar contendo avobenzona. Por conta disso, há também um grande esforço, tanto da comunidade científica acadêmica quanto de centros de Pesquisa & Desenvolvimento de grandes empresas, na busca de novos filtros solares bem como de novas matérias-primas que aumentem a fotoestabilidade de filtros solares e, principalmente, da avobenzona; pois os estabilizadores de filtros solares disponíveis no mercado proporcionam certa proteção à avobenzona, entretanto não são capazes de neutralizar os radicais livres formados pela sua fotofragmentação (CHAUDHURI et al., 2006).

Quanto aos estabilizadores já estudados, podemos citar alguns que têm mostrado resultados promissores, como é o caso do bemotrizinol, também chamado de bis-etilexiloxifenol-metoxifenil-triazina, que é também usado como filtro e tem absorção em uma ampla faixa do UV (280-380 nm). Seu mecanismo de ação é duplo, tanto absorvendo, quanto refletindo os fótons da radiação UV. Além disso, já é descrito que ele confere fotoestabilidade a filtros solares contendo tanto o metoxicinamato de etil-hexila, quanto a avobenzona (CHATELAIN; GABARD, 2001).

Outro estabilizador também descrito na literatura é o dietil-hexilnaftalato que, ao ser associado à avobenzona, fornece uma base fotoestável, que pode, quando devidamente formulada, atenuar mais de 90% de ambas as radiações UVA e UVB (BONDA, 2000).

Estudos indicam que o benzotriazolil dodecil p-cresol têm mostrado bons resultados devido ao seu alto desempenho em grande parte do UVA, ao contrário de muitos outros estabilizadores (MERCKEL; ROHWER, 2001).

Outra substância utilizada tanto como estabilizador, quanto como filtro solar é o octocrileno, que, segundo Mendrok-Edinger et al. (2009), apresenta ótimos resultados como estabilizador da avobenzona, também contribuindo para aumentar o FPS, por ser um filtro UVB. Segundo o mesmo estudo, esse sistema de fotoestabilização poderia, então, contribuir para a obtenção de uma formulação de alta proteção em UVA e ao mesmo tempo apresentar fotoestabilidade.

Nesse campo, muitos estudos de fotoestabilidade têm sido realizados, geralmente utilizando-se de técnicas *in vitro,* como por exemplo, por técnicas de separação, tal como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; DEFLANDRE; LANG, 1988; BERSET et al., 1996).

Além disso, nosso grupo de pesquisa tem apresentado algumas contribuições nessa área, uma vez que avaliamos a fotoestabilidade de algumas associações de filtros solares e a influência da fotoestabilidade na segurança e eficácia de fotoprotetores e obtivemos associações fotoestáveis contendo diferentes filtros solares (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2004, 2006; GASPAR et al., 2006; BENEVENUTO et al., 2010).

Outro ponto relevante atualmente é o uso de substâncias antioxidantes, uma vez que há no mercado um grande número de formulações cosméticas para uso diário contendo diferentes substâncias antioxidantes que atuam na prevenção e no tratamento do envelhecimento cutâneo, tais como extratos vegetais, proteínas e vitaminas (TOLLESON et al., 2005; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007), o que torna de fundamental importância a avaliação do uso de determinadas associações na estabilidade, segurança e eficácia das formulações contendo essas substâncias ativas.

Dentre as vitaminas muito usadas em cosméticos, podemos citar a vitamina A (retinol) e seus derivados, que são utilizados tanto para a proteção, quanto para estimular a recuperação da pele fotodanificada. Essa vitamina tem sido descrita como um importante regulador da diferenciação e manutenção celular (TOLLESON et al., 2005), apresentando ainda como função a absorção da radiação UV e proteção do DNA contra os danos provocados pela radiação solar (ANTILLE et al., 2003), a inibição da lipoperoxidação (PIERGIACOMI et al., 2001) e a promoção da hidratação intra e extracelular, aumentando a espessura da epiderme (MAIA CAMPOS et al., 1999).

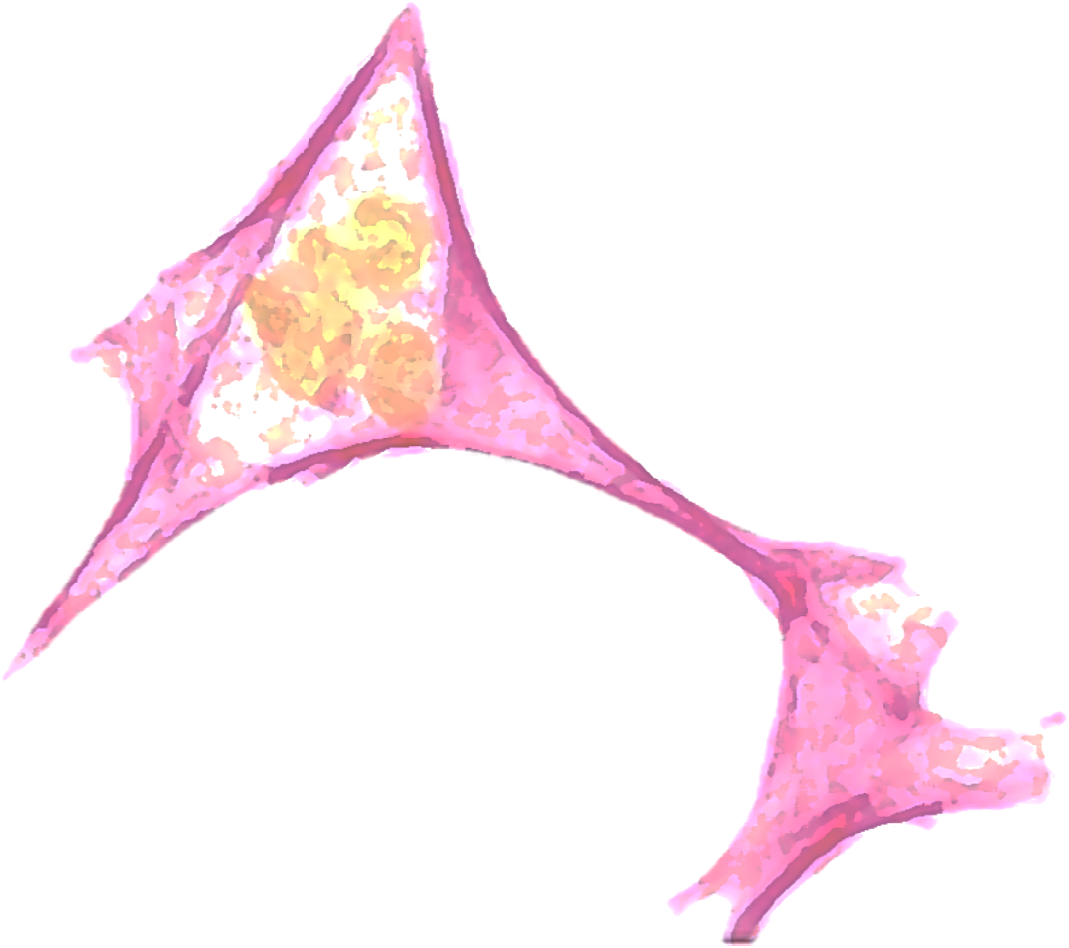
Entretanto, a vitamina A palmitato (palmitato de retinila) pode apresentar degradação frente à radiação UV, o que também evidencia a grande importância da realização de estudos que investiguem novas substâncias que apresentem como finalidade aumentar a estabilidade dessa vitamina frente à exposição à radiação UV.

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa observou que formulações contendo vitamina A atuaram na renovação celular e na função barreira da pele, entretanto essa vitamina pode causar irritação cutânea (MAIA CAMPOS et al., 2007). Em outro estudo, observamos que a associação dos ésteres das vitaminas A, C e E com filtros solares reduziu a irritação causada pela vitamina A bem como a sua degradação frente à radiação UV; entretanto mesmo com a utilização de uma associação de filtros solares fotoestável houve degradação pronunciada da vitamina A palmitato, o que pode levar à perda da eficiência da formulação bem como à formação de subprodutos tóxicos (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007; CAMBON et al., 2001; RIEGER, 1997; GERHARD et al., 2001).

Assim, além da fotoestabilidade, outros parâmetros de segurança são extremamente necessários para produtos cosméticos de uso tópico, dos quais podemos citar irritação, sensibilização, toxicidade e carcinogenicidade. Além disso, de acordo com a região e horário de aplicação da formulação cosmética, deve ser considerada, ainda, uma potencial interação com a radiação UV e a produção de irritação, sensibilização, toxicidade ou carcinogenicidade fotoinduzidas (HAYDEN et al., 2003). Um dos testes de fototoxicidade que foram cientificamente validados pela Comunidade Européia e pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) é o 3T3 NRU PT, definido como uma resposta tóxica clara depois da primeira exposição de fibroblastos a agentes químicos, e posterior exposição à irradiação (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998; LIEBSCH et al., 2005).

Levando em consideração as evidências científicas dos estudos de validação, bem como os dados de laboratórios industriais, o consenso foi alcançado internacionalmente que os métodos *in vitro* têm capacidade para abranger o teste para potencial de fototoxicidade aguda. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, o validado 3T3 NRU PT é o teste principal, que normalmente é apenas o único ensaio exigido para a determinação da fototoxicidade aguda quando a substância não apresenta potencial fototóxico (LIEBSCH et al., 2005).

Finalizando, há um grande empenho tanto dos órgãos governamentais de saúde quanto da comunidade científica para a redução do uso de animais de experimentação baseado no conceito dos 3R's. Esse conceito representa o refinamento, redução e substituição de animais de experimentação (*Refine, Reduction e Replacement*) e tem como estratégia, uma pesquisa racional minimizando o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado. O Governo Federal, por meio da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, estabeleceu procedimentos para o uso científico de animais criando o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) com o objetivo de formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica e monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa. Dessa maneira o presente estudo apresenta uma grande importância uma vez que teve como proposta a obtenção de novas formulações fotoprotetoras fotoestáveis e seguras por meio da avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares e estabilizadores de filtros solares, associados ao retinol e ao palmitato de retinila.



2. Revisão de Literatura

2.1. A Radiação UV e a Pele

O espectro eletromagnético emitido pelo Sol abrange uma enorme quantidade de comprimentos de onda, sendo que percorre desde 10^{-12}nm (raios-γ) até 10^{4}nm (ondas de rádio). Essas ondas apresentam dimensões tão diferentes, que vão desde o tamanho de um núcleo atômico, podendo chegar até o tamanho de edifícios (Figura 1).

A radiação Ultravioleta (UV) é um pequeno componente do espectro eletromagnético, que é definido por comprimento de onda (λ) e frequência (*f*) (MATTS, 2006), sendo dividida em UVA (320-400), UVB (280-320) e UVC (200-280) (ANVISA, 2012).

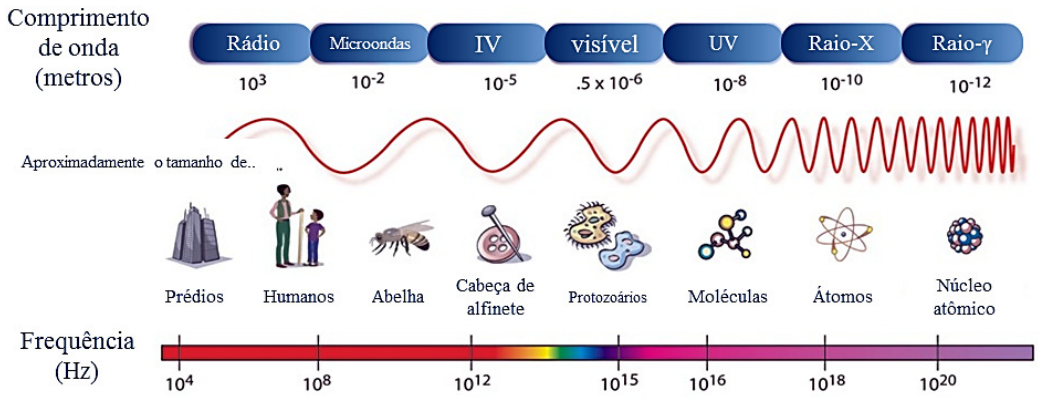


Figura 1: Espectro eletromagnético emitido pelo Sol. My Data Nasa. Disponível em: https://mynasadata.larc.nasa.gov/ElectroMag.html. Acesso em 01 de julho de 2012.

Em relação à radiação UV que atinge a superfície da Terra, 90-99% da radiação é UVA, apenas 1-10% é UVB e o UVC não atinge a Terra, sendo filtrado pela camada de ozônio (MILLER et al, 1998. PASTILA; LESZCZYNSKI, 2007). As subdivisões do UV foram adotadas com base em suas propriedades biológicas.

A radiação UVA apresenta um maior comprimento de onda (menor frequência e energia), o que faz com que ela seja capaz de penetrar em camadas mais profundas da pele, além de ser responsável pelo envelhecimento da pele e induzir ao bronzeamento, a pigmentação imediata e persistente da pele. Já a radiação UVB apresenta um comprimento de onda menor (maior frequência e energia), sendo apenas capaz de penetrar nas camadas mais superficiais da epiderme, sendo também responsável por causar queimaduras solares, câncer de pele e fotoenvelhecimento (NARAYANAN et al, 2010).

Como ambas as radiações UVA e UVB são suficientemente enérgicas para afetar a pele, a exposição à radiação UV pode causar vários danos à pele, sendo considerados agudos

ou crônicos. Os principais efeitos agudos são o eritema (inflamação) e o bronzeamento (aumento da melanogênese) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

Já em relação aos efeitos crônicos da exposição ao UV, há uma deterioração gradual das estruturas e da função da pele, devido ao dano cumulativo do DNA e das inflamações crônicas (WLASCHEK et al., 2001; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). Além disso, a exposição crônica à radiação UV leva ao envelhecimento da pele, rugas, pigmentação irregular, perda de elasticidade e alterações na função barreira da pele (SCHROEDER et al, 2008).

Enquanto o UVB é eritematogênico e carcinogênico, o UVA, além de induzir o fotoenvelhecimento e causar danos diretos ao DNA, RNA e proteínas, também desempenha um importante papel na indução do eritema pela geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), como a formação do oxigênio singleto, o ânion superóxido e o radical hidroxila, que causam danos ao DNA e a membranas celulares e promovem carcinogênese e mudanças associadas com o fotoenvelhecimento (PATHAK; CARRARO, 1988).

A primeira associação entre o desenvolvimento de câncer de pele e a luz solar foi descrita 1894 (GAMAGE, et al., 1988). Desde então, muitas correlações têm sido feitas no sentido de associar a incidência do câncer de pele não-melanoma com uma exposição cumulativa à radiação solar (TEDESCO et al, 2007).

A pele apresenta diversos cromóforos, sendo que a absorção de fótons do UV leva a uma série de reações fotoquímicas, que por sua vez levam a uma resposta inflamatória fotoinduzida. Dentre os cromóforos da pele, estão as bases nitrogenadas, que absorvem no UVB; os aminoácidos, dentre os quais estão a tirosina e o triptofano, que são os aminoácidos aromáticos mais comum e também absorvem em UVB; e o ácido urocânico, que é o principal cromóforo que absorve UV no estrato córneo cujo pico de absorção está em 275nm (TEDESCO et al, 2007).

A absorção da radiação UV pelos cromóforos da pele leva a formação de radicais livres, que são espécies quimicamente reativas as quais possuem um elétron desemparelhado em seu orbital, os quais podem sofrer transferência de elétrons ou reações de adição com diferentes componentes celulares e, assim, têm sido relacionados com a etiopatogenia de diversas doenças (TEDESCO et al, 2007).

Acredita-se que os efeitos prejudiciais da radiação UV na pele são causados por dano celular direto e alterações na função imunológica. A radiação UV produz dano ao DNA (formação de dímeros de pirimidina ciclobutano), mutação gênica, imunossupressão, estresse oxidativo e respostas inflamatórias, os quais têm um importante papel no fotoenvelhecimento

e no câncer da pele (MEERAN et al, 2008). Assim, apesar da patogênese do câncer ser multifuncional, a radiação UV tem sido descrita como um grande colaborador, por ser um carcinógeno potente (PRESTON; STERN, 1992. DIEPGEN; MAHLER, 2002. GILCHREST et al., 1999.).

O gene supressor de tumor p53 apresenta fundamental importância na carcinogênese, uma vez que permite tanto o reparo do DNA, quanto a apoptose da célula quando o dano ao genoma é muito grande (HORNUNG, 2011). No entanto células contendo p53 mutante podem ser encontradas em pele com dano solar crônico, bem como em queratoses actínicas, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (MARROT; MEUNIER, 2008), o que leva a crer que a radiação UV pode induzir mutações no gene supressor de tumor p53, conduzindo à iniciação do câncer de pele (BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007).

A imunossupressão também é considerada um importante evento na carcinogênese da pele (BRENNER; HEARING, 2008). A exposição ao UV produz efeitos prejudiciais no sistema imune da pele: diminuindo a função de apresentação de antígeno, induzindo a produção de citocinas imunossupressoras e modulando reações de hipersensibilidade tipo tardio e de contato (BEISSERT; SCHWARZ, 1999).

Atualmente, cerca de 65–90% dos cânceres de pele tipo melanoma estão associados à exposição à radiação UV (GLANZ et al, 2007). A radiação UVA tem um importante papel na carcinogênese de células tronco da pele (MEERAN et al, 2008), enquanto a radiação UVB induz dano ao DNA, que causa respostas inflamatórias e tumorogenicidade (BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007).

O desenvolvimento do carcinoma basocelular, do carcinoma espinocelular e do melanoma maligno está frequentemente associado a queimaduras solares dolorosas (KENEDY et al, 2003). A exposição à radiação UV é conhecida como o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da queratose actínica, que pode ser um precursor do carcinoma espinocelular (KENEDY et al, 2003).

Exposições intermitentes intensas estão relacionadas a um maior risco para o desenvolvimento do carcinoma basocelular e do melanoma, ao serem comparadas a exposições crônicas leves, mesmo que a dose total de radiação UV de ambas as exposições seja a mesma. Por outro lado, o risco para o carcinoma espinocelular está fortemente associado coma exposição crônica ao UV, mas não com a exposição intermitente (WESTERDAHL et al, 1994).

2.2. Filtros Solares e a Fotoproteção

Segundo alguns estudos (LIM, DRAELLOS, 2009), a história da fotoproteção começou em 1801, com o descobrimento dos raios ultravioleta (UV) pelo alemão Ritter. Inicialmente, acreditava-se que a queimadura solar estava associada com o calor do Sol, mas em 1820, Home descobriu que a queimadura solar estava associada, não ao calor, mas à exposição ao UV. Após esses estudos, começaram a surgir, em várias partes do mundo, especialmente na Europa e nos Estados Unidos, estudos relacionados à fotoproteção, bem como a descoberta de novas substâncias, as quais se tornaram precursoras dos atuais filtros solares. Nesse contexto, um dos primeiros relatos é de 1887, em que Veiel descreve o uso de tanino como um agente fotoprotetor (LIM, DRAELOS, 2009).

Em 1891, Hammer publicou uma monografia discutindo a fotoproteção e diversos agentes tópicos capazes de prevenir a queimadura solar, sendo o primeiro a recomendar o uso de substâncias químicas como filtros solares (URBACH, 2001). Já Unna, em 1911, usou pela primeira vez o sulfato de quinino acidificado e depois a esculina (extrato de castanha, que é usado em medicina popular) como substâncias fotoprotetoras (URBACH, 2001).

Em 1928, surgiu, nos Estados Unidos, o primeiro filtro solar comercial (SHAATH, 1990), uma emulsão contendo salicilato de benzila e cinamato de benzila. Na Alemanha o primeiro filtro solar comercial tornou-se disponível em 1933, o qual era uma pomada contendo ácido benzimidazol sulfônico (LIM, DRAELOS, 2009). Já na França, o primeiro filtro solar surgiu em 1936, uma formulação oleosa contendo salicilato de benzila, que foi vendida como *Ambre Solaire* por Schueller, o futuro fundador da L'Oreal (REBUT, 1990).

Começou a crescer também o número de patentes de novas substâncias. Em 1943, o ácido para-aminobenzóico (PABA) foi patenteado, mas somente foi comercializado como filtro solar muito tempo depois (MACKIE; MACKIE, 1999).

Em 1944, uma das substâncias conhecidas até hoje como o primeiro filtro solar amplamente utilizado, foi o petrolato veterinário vermelho (*red veterinary petrolatum*), produzido nos Estados Unidos por Greene, o fundador da Coppertone (LIM, DRAELOS, 2009).

Durante a Segunda Guerra Mundial, houve uma grande necessidade de proteção solar eficaz para os soldados envolvidos na guerra tropical. O petrolato veterinário vermelho era uma das substâncias mais práticas e eficazes para o uso na época (MacEACHERN, JILLSON, 1946). Entretanto, era um bloqueador físico com uma eficácia limitada, além de ser uma substância vermelha, desagradável e pegajosa. Deveria ser aplicada uma camada grossa dele

para que fosse eficaz, por isso, muitos soldados desenvolveram queimaduras solares nas áreas onde não aplicaram uma camada suficientemente grossa.

A partir daí houve um crescimento das substâncias utilizadas e patenteadas: em 1948 ésteres de PABA mais efetivos foram disponibilizados no mercado (KUMLER; DANIELS, 1948). Em 1962, a benzofenona, *3-benzyl-4-hydroxy-6-methoxy-benzenesulfonic acid*, foi introduzida como filtro solar (URBACH, 2001). Em 1977, o primeiro filtro solar hidrorresistente tornou-se disponível (THOMAS; LIM, 2003). Em 1979, bons filtros UVA se tornaram disponíveis no mercado, sendo que os primeiros filtros UVA foram os derivados do dibenzoilmetano. Em 1989, foram introduzidas partículas inorgâncias micronizadas, o dióxido de titânio e o óxido de zinco (ROELANDTS, 1995).

Atualmente, após tantas patentes e descobertas, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos (ANVISA, 2012), define que **protetor solar** é "*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 UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação*".

Dessa forma, os filtros solares podem ser divididos em filtros inorgânicos (ou físicos), os quais refletem ou dissipam a luz UV e em orgânicos (ou químicos), os quais absorvem a radiação (ANVISA, 2012). Os absorvedores de radiação UV podem ser divididos em diferentes classes, segundo suas estruturas químicas, sendo que dentre essas classes estão amibobenzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, derivados de cânfora, derivados de triazina, derivados de benzotriazóis, cianoacrilatos, dibenzoilmetanos. Essas classes estão apresentadas na Figura 2, que também apresenta as faixas de absorção da radiação UV dessas diferentes classes.

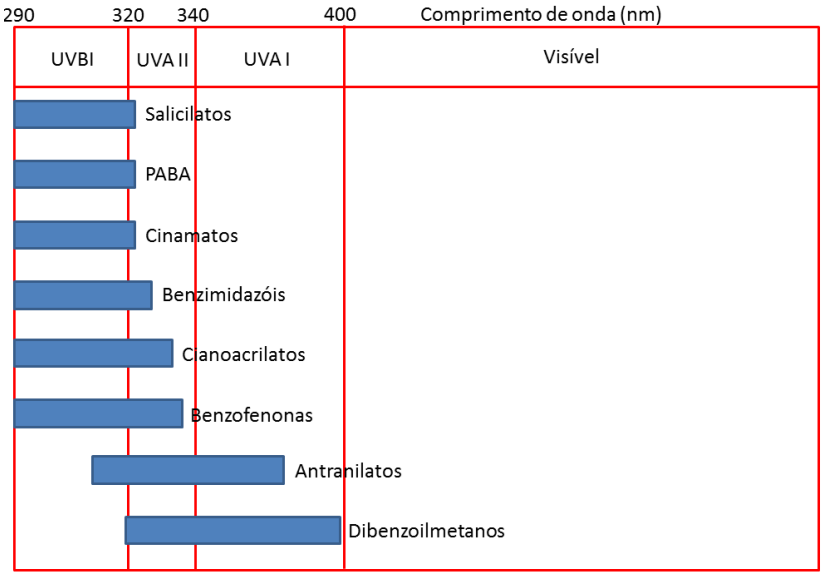


Figura 2: Intervalo de eficácia para diferentes classes de filtros solares orgânicos. Adaptado de FORESTIER, 2008.

Os **aminobenzoatos** (derivados de PABA) estão entre as primeiras moléculas usadas entre os filtros solares. Essas moléculas apresentam um anel aromático dissubstituído em posição *para* por um grupo doador de elétron amino (NR_2) e um grupo aceptor de elétrons ácido carboxílico (COOR), que permitem a deslocalização da nuvem de elétrons na molécula (SHAATH, 2010) (Figura 3).

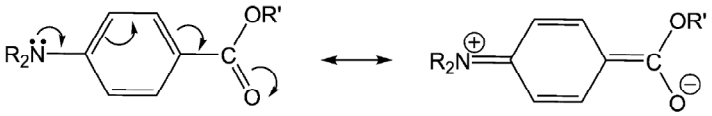


Figura 3: Mecanismo de deslocalização dos aminobenzoatos. SHAATH, 2010.

Muitos estudos demonstraram o potencial fotoalergênico do PABA em cobaias (GERBERICK; RYAN, 1989), o que também foi confirmado em humanos (NASH, 2006). Esses resultados decorrem de sua fotoativação (ALLEN et al, 1996) e de sua fotodegradação (GASPARRO, 1985). Por esse motivo, o uso do PABA em filtros solares foi interrompido e o *claim* "livre de PABA/PABA-*free*" é usado até hoje (NASH, 2006).

Os **salicilatos** são moléculas que apresentam substituição na posição *orto* com um arranjo espacial que permite ligações de hidrogênio dentro da própria molécula, que permitem que a molécula necessite de uma menor quantidade de energia (alto comprimento de onda) para absorver UV (SHAATH, 2010) (Figura 4).

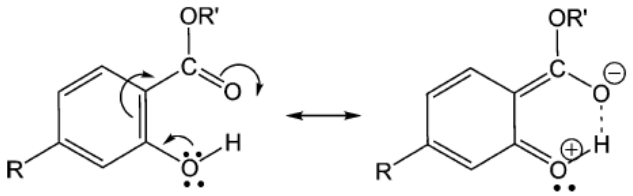


Figura 4: Mecanismo de deslocalização eletrônica dos salicilatos. SHAATH, 2010.

Os principais representantes dessa classe são salicilato de etil-hexila e homosalato, que são considerados fracos absorvedores UV, porém são considerados fotoestáveis. O salicilato de etil-hexila é também empregado como solvente para outros filtros solares, especialmente para a avobenzona e esses filtros solares raramente aparecem sozinhos em uma formulação (NASH, 2006).

Os salicilatos são geralmente bem tolerados pela pele, sendo que reações de sensibilização, fotocontato e irritação da pele induzidas por esses compostos são raras (DROMGOOLE; MAIBACH, 1990). Estudos indicam que apenas 1% da dose aplicada de salicilato de etil-hexila penetra na pele humana (CHATELAIN et al., 2003; WALTERS et al., 1997). Análises dos efeitos estrogênio-*like* mostraram esse efeito *in vitro*, mas não *in vivo* (MOROHOSHI et al., 2005). Dessa forma, os salicilatos apresentam um perfil toxicológico favorável para o uso em filtros solares (NASH, 2006).

Os **cinamatos** são moléculas que apresentam um anel aromático dissubstituído com um grupo doador de elétrons (OCH_3) e um grupo aceptor de elétrons (éster conjugado com dupla ligação). Isto permite a deslocalização eletrônica, tornando a molécula capaz de absorver na região de 310nm (SHAATH, 2010) (Figura 5).

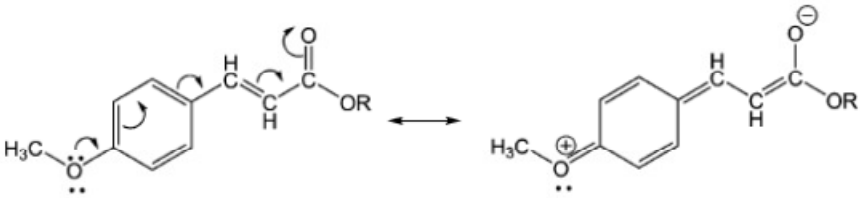


Figura 5: Mecanismo de deslocalização eletrônica dos cinamatos. SHAATH, 2010.

Os cinamatos estão sujeitos a fotoisomerização *cis-trans* (*cis* – isômero *Z*; *trans* – isômero *E*). Enquanto o isômero *E* é predominante e apresenta um $\lambda_{máx}$ de 310nm, com um coeficiente de absortividade molar (ε) de 19500 $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$, o isômero cis, que é formado pela absorção da luz, apresenta um $\lambda_{máx}$ de 312nm, com um menor ε, de 10000 $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$, o que resulta em uma diminuição da absorção da luz UV (SHAATH, 2010).

O metoxicinamato de etil-hexila é o filtro solar mais utilizado no mundo (NASH, 2006) e, sua fotoisomerização cis-trans já é bem prevista e estudada. A aplicação tópica do metoxicinamato de etil-hexila é bem tolerada (NASH, 2006), sendo que a incidência de fotodermatites provocadas por essa substância é considerada muito baixa (DARVAY, 2001). Estudos de permeação cutânea *in vitro* mostram que há uma penetração de 0,2-0,4% da dose aplicada desse filtro solar, outros estudos revelam que valores podem estar superestimados quando comparados a estudos em humanos (CHATELAIN et al., 2003; JANJUA et al., 2004). Embora o metoxicinamato de etil-hexila apresente efeito estrogênio-*like in vivo* (SEIDLOVA-WUTTKE et al., 2005), porém este efeito não foi observado em seres humanos (JANJUA et al., 2004).

As **benzofenonas**, ao contrário da maioria dos filtros solares, são cetonas aromáticas, ou seja, apresentam um grupamento cetona ligado ao anel aromático. O anel aromático pode estar substituído nas posições *orto*, *para* ou em ambas, por um grupo doador de elétrons, o que as leva a apresentar dois $\lambda_{máx}$ em 286nm e em 324nm (SHAATH, 2010) (Figura 6).

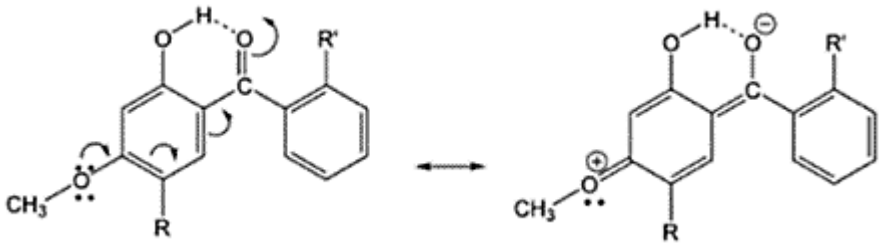


Figura 6: Mecanismo de deslocalização eletrônica das benzofenonas. SHAATH, 2010.

Dentre as benzofenonas, a benzofenona-3 tem sido descrita como o filtro solar responsável pela maior incidência de fotodermatites (SCHAUDER; IPPEN, 1997), além de ser absorvida sistemicamente (JIANG et al, 1999). Alguns estudos também têm relatado efeitos estrogênio-*like* (SUZUKI et al, 2005) e efeitos antiandrogênicos da benzofenona-3 (MA et al, 2003). No entanto, estes resultados foram baseados em estudos realizados *in vitro* e a experiência de mercado com as benzofenonas tem sido favorável a seu uso em filtros solares (NASH, 2006).

Os **derivados de cânfora** protegem contra a radiação UVB na região de 290-300nm. Assim como os cinamatos, se isomerizam atingindo o equilíbrio entre a formação dos isômeros, logo após a exposição à luz; apresentam, ainda, boa fotoestabilidade (DEFLANDRE; LANG, 1988) (Figura 7).

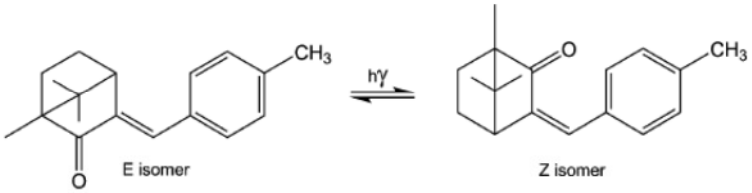


Figura 7: Fotoisomerização dos derivados de cânfora. SHAATH, 2010.

Dentre as moléculas que apresentam alto peso molecular (mais que 500 Daltons), estão os **derivados de triazina,** que estão em alta em novas patentes. Entre estas moléculas, estão substâncias como o caso do bemotrizinol (629 Dalton) da octil triazona (PM = 823 Dalton), cuja vantagem no uso é a diminuição de sua penetração na pele que têm atualmente sido o alvo de inúmeras pesquisas e patentes (SHAATH, 2010).

Os **derivados de benzotriazóis** são bons absorvedores em UVB e UVA, com comprimento de onda máximo de absorção próximo de 305nm. São compostos heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio. Um dos representantes é o benzotriazolil dodecil p-cresol, cuja estrutura molecular está representada na Figura 8.

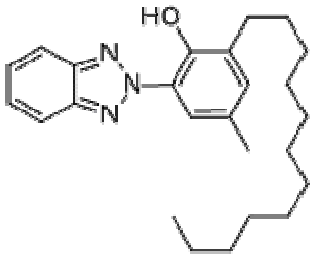


Figura 8: Benzotriazolil dodecil p-cresol. Chemical Book. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5499652.htm . Acesso em 12 de julho de 2012.

Dentre os **cianoacrilatos**, o octocrileno é o representante mais pronunciado desta classe (Figura 9). Até pouco tempo atrás, não havia evidências de sensibilização por contato, no entanto, novos estudos apontam um potenciam fotoalergênico do octocrileno, levando a dermatites de contato. (AVENEL-AUDRAN et al, 2010). Porém, mais estudos são necessários.

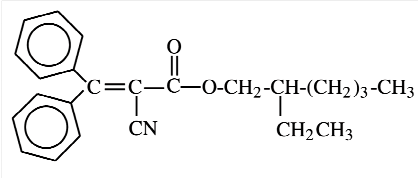


Figura 9: Octocrileno. SALVADOR; CHISVERT, 2007. Analysis of Cosmetic Products.

Em relação aos **dibenzoilmetanos**, a avobenzona é o principal representante da classe (Figura 10). Embora muitos filtros UVB estejam disponíveis no mercado, há poucas moléculas capazes de absorver no espectro do UVA, sendo que a avobenzona (Figura 10) é o representante mais importante, devido sua habilidade de absorção no UVA e sua disponibilidade comercial (LHIAUBET-VALLET et al, 2010).

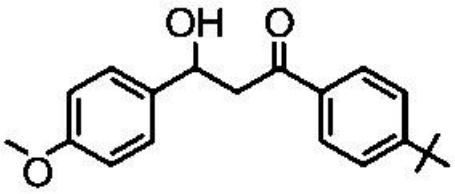


Figura 10: Estrutura molecular da avobenzona. DSM. Disponível em: http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/118_033_DSM_Parsol_1789.pdf. Acesso em 01 de julho de 2012

Segundo a base de dados de produtos cosméticos do *Environmental Working Group* (2012), a avobenzona, também chamada de butil metoxidibenzoilmetano (BMDBM), está presente em mais de 250 filtros solares com FPS maior que 30 e em mais de 140 com FPS 15-30. Esse fato é claramente evidenciado uma vez que a molécula da avobenzona apresenta a capacidade de absorver grande parte dos fótons do UVA (Figura 11).

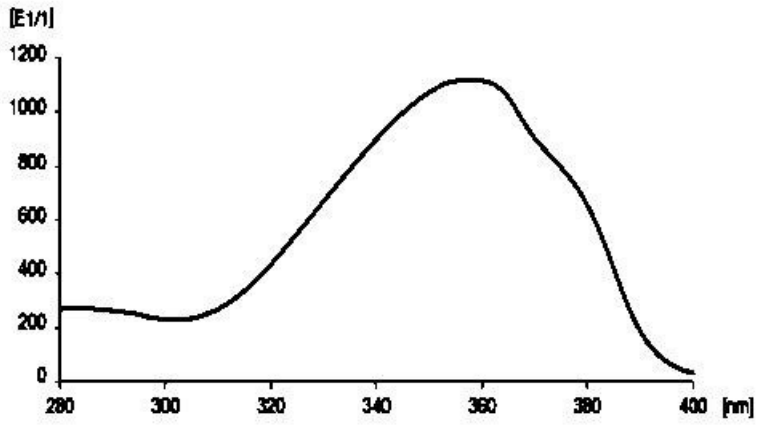


Figura 11: Espectro de absorção da avobenzona. DSM. Disponível em: http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/118_033_DSM_Parsol_1789.pdf. Acesso em 01 de julho de 2012

Em relação a outros filtros solares utilizados no mercado, a avobenzona também se destaca, por apresentar uma nítida absorção na faixa do UVA quando comparada com outras moléculas (Figura 11 e Figura 2). Embora a avobenzona apresente um espectro de absorção apropriado no UVA e por isso esteja presente em diversas formulações cosméticas fotoprotetoras, essa molécula pode exibir certa fotorreatividade quando exposta ao UV.

Outro aspecto importante é o fato da avobenzona apresentar tautomerização ceto-enólica (AVO^E - AVO^K) (Figura 12). Enquanto o tautômero dicetona (AVO^K) apresenta uma molécula simétrica, existindo, portanto, uma só configuração do mesmo, o tautômero enol (AVO^E) não apresenta tal simetria, sendo portanto capaz de apresentar diversas configurações do mesmo tautômero. As formas mais evidentes são **A** e **B**, apresentadas na Figura 12, que são formas *cis*-enol, as quais são estabilizadas por uma ligação de H intramolecular, formando o chamado "enol quelado" (MTURI; MARTINCIGH, 2008). O tautomerismo apresentado pela avobenzona e as propriedades fotoquímicas desses tautômeros fazem com que a fotoquímica da avobenzona seja muito complexa.

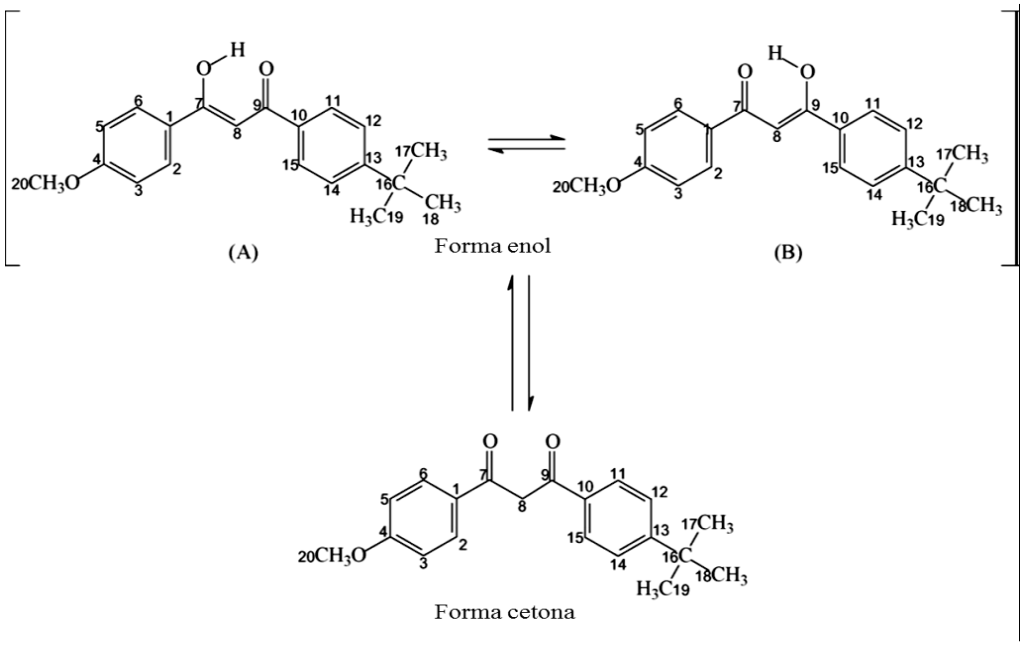


Figura 12: Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona. MTURI; MARTINCIGH, 2008. A e B: tautômeros *cis*-enol.

Em solução, há um equilíbrio entre AVO^E-AVO^K presentes e a quantidade relativa dos dois tautômeros encontra-se na direção da formação do tautômero AVO^E, o que é muito vantajoso, visto que enquanto AVO^E apresenta uma boa absorção no UVA, AVO^K apresenta um espectro de absorção no UVC, em 260-280nm (MTURI; MARTINCIGH, 2008).

Entretanto, sob a exposição à radiação UV, o equilíbrio ceto-enólico é deslocado a favor da formação de AVO^K (Processo I – Figura 13), que, por sua vez, absorve a luz e atinge o estado excitado tripleto ($^3AVO^K$), (Processo II - Figura 13). Embora a AVO^K exiba absorção máxima no UVC, seu espectro de absorção apresenta uma cauda que alcança a faixa UVB, permitindo que AVO^K seja excitada em um comprimento de onda maior que 290nm. Isso faz com que esta espécie excitada seja responsável pela maioria dos efeitos prejudiciais da AVO. A fotodegradação irreversível da AVO está relacionada ao processo que ocorre com a $^3AVO^K$. Além disso, $^3AVO^K$ pode formar oxigênio singleto (Processo IV - Figura 13), que reage com a forma enólica (AVO^E), levando à formação de produtos de oxidação (Processo V - Figura 13) (LHIAUBET-VALLET, 2010).

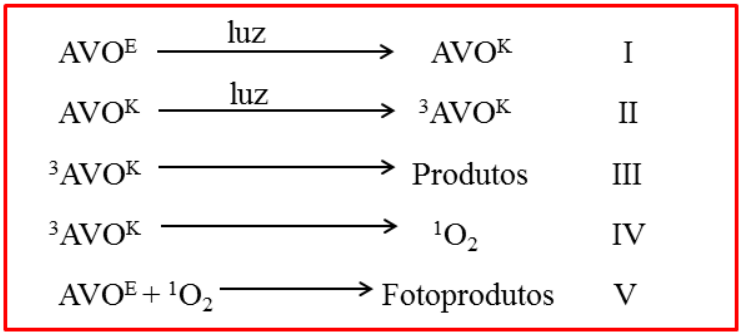


Figura 13: Diferentes Processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona. Adaptado de LHIAUBET-VALLET, 2010.

Dessa forma, torna-se necessário o emprego de substâncias capazes de promover a fotoestabilização da avobenzona, como filtros solares e estabilizadores de filtros solares, para que não haja um prejuízo para o consumidor.

2.3. Fotoestabilidade e Estabilizadores de Filtros Solares

Com a absorção de um fóton, um filtro solar orgânico, também conhecido como químico, vai do estado fundamental eletrônico (S0) para o primeiro estado excitado eletrônico (Figura 14), o estado excitado singleto (S1). A energia absorvida pode ser eliminada por diversas vias. Do estado excitado S1, ela pode ser liberada diretamente via fluorescência (uma transição radiativa) ou sofrendo fotorreações. Existem também transições não-radiativas, pelas quais a energia absorvida é redistribuída dentro da molécula (LIM, DRAELOS, 2009).

Pode ocorrer também a transição intersistemas, levando ao estado excitado tripleto T1, cuja energia pode ser dissipada pela emissão de um fóton (fosforescência), por transferência para outras moléculas (sensibilização), ou por fotoreações. Há também a conversão para o estado fundamental vibracionalmente excitado S0*, que pode dissipar sua energia através de emissão no infravermelho, de fótons, ou desativação por colisões com moléculas vizinhas (LIM, DRAELOS, 2009).

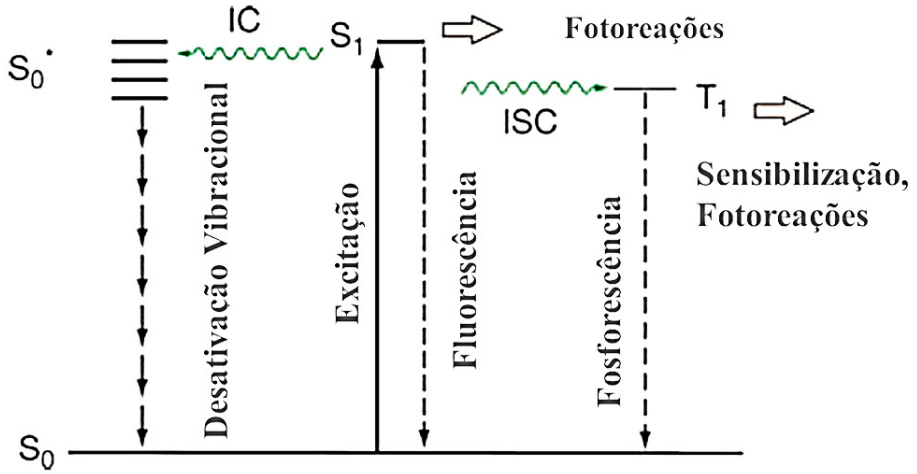


Figura 14: Diagrama de Jablonski mostrando a excitação das moléculas orgânicas por fótons e suas vias desativação. Abreviações: IC: Conversão Interna; ISC: Cruzamento intersistemas; S0: Estado fundamental; S0*: Estado fundamental com energia vibracional; S1: Primeiro estado excitado singleto; T1: Estado excitado tripleto. LIM, DRAELOS, 2009.

Nas fotoreações, mudanças estruturais podem ocorrer, as quais podem ser reversíveis, como isomerizações (cis/trans ou ceto/enol), ou irreversíveis, as quais são um problema de fotoinstabilidade.

Um dos resultados é a conversão do oxigênio tripleto em singleto, o que leva à formação de espécies reativas do oxigênio (ERO´s). As reações envolvendo o estado excitado singleto do oxigênio desempenham um papel fundamental em processos fotoquímicos e fotobiológicos naturais, tais como fotodegradação e processos de envelhecimento, incluindo até mesmo fotocarcinogênese (SCHWEITZER; SCHMIDT, 2003). Nesse contexto, é necessário que o formulador saiba combinar os diferentes filtros solares e moléculas conhecidas como estabilizadores de filtros solares, com intuito de estabilizar os filtros solares e prevenir a formação de intermediários reativos.

Segundo Bonda (2007), estabilizadores de filtros solares são moléculas orgânicas que ajudam a prevenir a perda de eficácia dos filtros solares frente à luz. Essas moléculas podem agir de duas diferentes formas:

- Estabilização estrutural e geométrica do filtro solar, através de interações eletrostáticas e de van der Waals, tornando os filtros menos propensos a participarem de reações químicas.
- Estabilização por dissipação da energia, reduzindo a possibilidade de uma reação química, o que é chamado de transferência de energia, que pode acontecer quando o filtro solar e o estabilizador de filtros solares fazem o intercâmbio dos elétrons,

ou mesmo pela ação a distância, como um rádio transmite um sinal a um receptor próximo.

Nesse contexto, o termo "*quenching*" (*do inglês: apagar; sufocar, afogar; extinguir, dissipar; sossegar; oprimir; temperar ou esfriar – Dicionário Escolar FENAME – Ministério da Cultura, 1957*) é muito utilizado, uma vez que pode ser aplicado para qualquer processo que desativa uma molécula no estado excitado. Entretanto, no contexto da fotoproteção, *quenching* significa desativação por um conjunto particular de processos conhecidos como transferência de energia (BONDA, et al., 2010).

Dessa forma, os estabilizadores de filtros solares são considerados *quenchers* para os filtros solares, uma vez que os ajudam a dissipar a energia do estado excitado, agindo de diferentes formas (SHAATH, 2010; BONDA et al., 2010):

- ***Quenchers* de EROs**

São substâncias que possuem atividade antioxidante com potencial de neutralizar o oxigênio singleto e as espécies reativas do oxigênio (EROs).

- ***Quenchers* do estado excitado Tripleto**

São substâncias que têm a habilidade de neutralizar o estado excitado tripleto de um filtro solar fazendo com que este filtro volte ao seu estado basal e diminuindo as chances de ocorrerem reações químicas destrutivas com esta molécula.

- ***Quenchers* do estado excitado Singleto**

São substâncias que têm a capacidade de reduzir o número de moléculas que sofrem a conversão intersistemas, alcançando o estado excitado tripleto, diminuindo as possibilidades de ocorrerem reações fotoquímicas destrutivas.

Os *quenchers* foram introduzidos na Europa para tentar amenizar os problemas de fotoinstabilidade da avobenzona (DEFLANDRE; LANG 1988). Sua inclusão abriu uma nova vertente para a utilização da avobenzona (MENDROK-EDINGER, 2009).

2.4. Vitamina A em cosméticos

Os efeitos da deficiência da vitamina A são conhecidos há pelo menos 3500 anos, sendo que os antigos egípcios podem ter sido os primeiros a reconhecerem a cegueira noturna, cuja causa é atualmente conhecida como sendo a deficiência de vitamina A (WOLF, 1996). Após diversas civilizações antigas terem relatado a cegueira noturna os danos epiteliais causados pela deficiência da vitamina A foram então primeiramente descritos pelo físico inglês George Budd (WOLF, 1996).

Em 1913, E. V. McCollum descobriu um fator de crescimento lipossolúvel, derivado da gordura da manteiga considerado essencial para o crescimento e sobrevivência, o *"fat-soluble fator A"* (fator lipossolúvel A) (WOLF, 1996). Na tentativa de isolar e identificar esse fator, Osborne e Mendel obtiveram um óleo amarelo da gordura da manteiga, da gordura da gema de ovo e do óleo de fígado de bacalhau, mas não da gordura de porco ou do óleo de oliva. E H. Steenbock então notou que alguns ativos de certos extratos, como da manteiga, da gema de ovo ou de vegetais como a cenoura eram amarelos. P. W. Boutwell propôs então que o fator A lipossolúvel estava, de alguma forma, associado com um pigmento amarelo (o β-caroteno) e sugeriu que este fator era então convertido a uma forma ativa incolor (vitamina A, retinol) (WOLF, 1996). Em 1930, T. Moore concluiu que o caroteno (amarelo) era a provitamina ou o precursor da vitamina A (incolor). Na década de 1930, Karrer, finalmente isolaram e determinaram a estrutura química do β-caroteno e do retinol (WOLF, 1996).

Atualmente, sabemos que as vitaminas são substâncias orgânicas essenciais para a vida e bem estar humano. Elas têm um papel fundamental regulando o metabolismo do corpo. Há 13 principais vitaminas as quais desempenham uma série de funções no corpo, sendo cada uma delas apresenta um mecanismo de ação distinto. As vitaminas diferem entre si na estrutura química e na função. São classificadas como hidro ou lipossolúveis, sendo que a vitamina A faz parte do grupo das vitaminas lipossolúveis.

Existem diversas formas do uso de vitamina A em cosméticos. As mais utilizadas são retinol, ésteres de retinila (acetato de retinila, propionato de retinila e palmitato de retinila) e retinaldeído. A unidade de medida das vitaminas é a Unidade Internacional (UI), uma unidade de medida baseada na medida da atividade biológica ou do efeito, usada para vitaminas e outras substâncias. No caso da vitamina A: 1UI vitamina A é o equivalente biológico a 0,3g retinol ou de 0,6g de caroteno. Segundo o parecer técnico da ANVISA, a vitamina A, nas suas formas retinol e ésteres de retinila, deve ser empregada em preparações cosméticas na concentração máxima de 10.000 UI de vitamina A/g de produto acabado (ANVISA, 2010).

Através de reações enzimáticas, todas as formas da vitamina A são convertidas, em último estágio ao ácido *trans*-retinóico, que é a forma ativa na pele. Os ésteres de retinila são especificamente convertidos a retinol, via enzimas chamadas esterases. O retinol é então convertido a retinaldeído pela retinol desidrogenase, que é finalmente oxidado a ácido trans-retinóico pela retinaldeído oxidase (Figura 15) (FU et al., 2007)..

Como a vitamina A é armazenada na pele na forma de palmitato de retinila, o estoque de retinol na pele humana depende da capacidade das células das camadas da pele em transformar retinol em ésteres de retinila (FU et al., 2007).

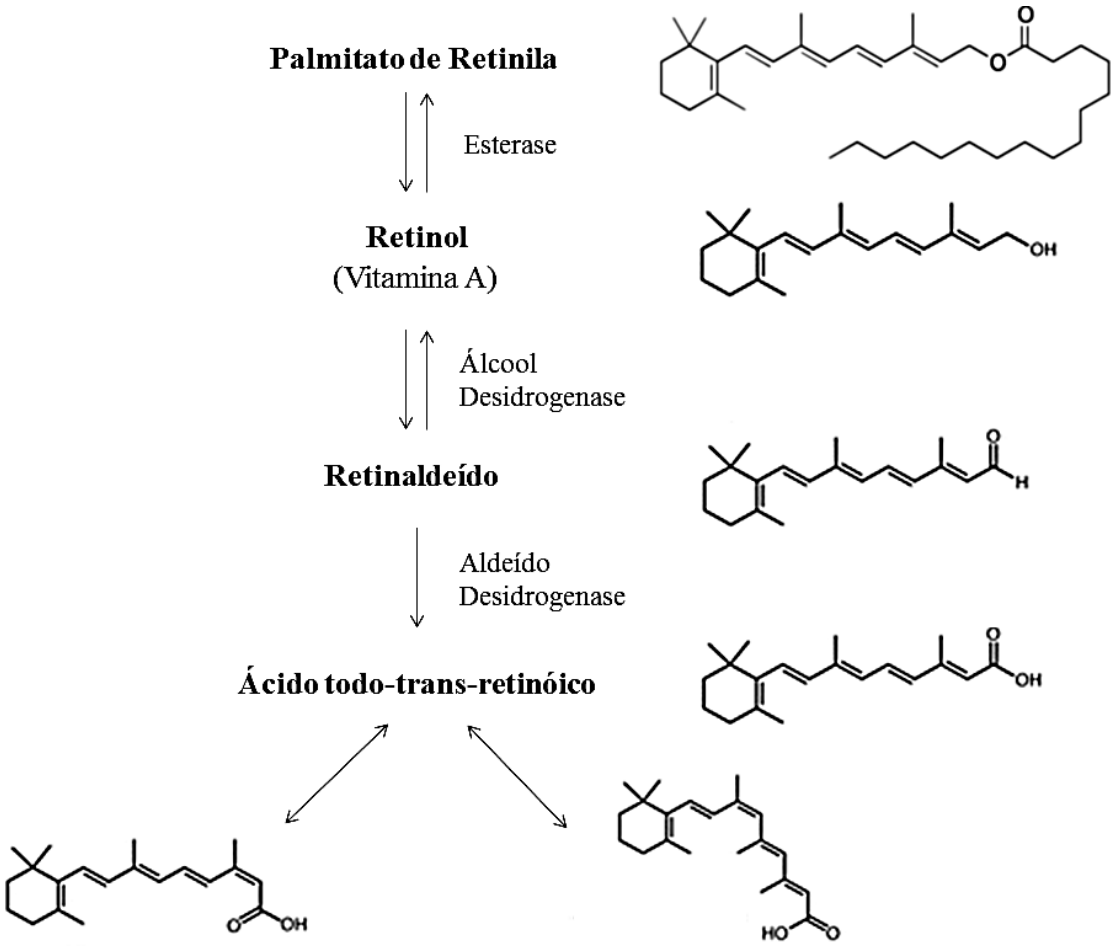


Figura 15: Metabolismo da vitamina A no organismo. Adaptado de FU et al., 2007.

Estudos mostram que a vitamina A apresenta propriedades antifotocarcinogênicas, além de proteger o DNA contra danos e outras propriedades biológicas relevantes para a prevenção da fotocarcinogênese (ANTILLE, et al, 2003). Assim, ela tem sido amplamente usada em cosméticos, especialmente em fotoprotetores. Segundo dados do *Environmental Working Group* (EWG, 2012), 31% dos filtros solares contêm palmitato de retinila.

No entanto, alguns estudos mostram que a vitamina A pode apresentar um efeito pró-oxidante na pele. A capacidade da vitamina A neutralizar EROs é ampliada na pele, através da complexa rede de antioxidantes encontradas no microambiente bioquímico normal da pele. Assim, a vitamina A, juntamente com antioxidantes enzimáticos (catalase, peroxidase, superóxido dismutase e glutationa redutase) e antioxidantes não-enzimáticos (vitamina C e vitamina E), pode neutralizar os radicais livres. No entanto, em um ambiente isolado, a interação cooperativa entre os antioxidantes estará ausente. Assim, as propriedades protetoras de um único antioxidante são rapidamente depletadas e podem mesmo vir a ter um efeito pró-

oxidante quando expostas a estímulos prejudiciais, como radicais livres (BURNETT; WANG, 2011).

2.5 Avaliação da performance de fotoprotetores

2.5.1 Eficácia

Paralelamente ao desenvolvimento de fotoprotetores, a história da fotoproteção traz consigo a avaliação destes novos produtos cosméticos. Após os estudos realizados por Home em 1820, Widmark, na Suécia, publicou uma confirmação de que a radiação UV causa eritema, o que levou ao começo da preocupação com os filtros solares e com a fotoproteção (LIM; DRAELOS, 2009).

Durante a Primeira Guerra Mundial, Hausser e Vahle, na Alemanha, elaboraram o primeiro estudo do espectro de ação detalhado do eritema e da pigmentação da pele humana. Eles mostraram que esses efeitos dependem da radiação UV, principalmente devido a comprimentos de onda menores que 320nm. Em 1922, publicam o espectro de ação para a indução do eritema e pigmentação na pele humana, usando um monocromador e uma lâmpada artificial de mercúrio (LIM; DRAELOS, 2009).

Já em Copenhagen, durante o Segundo Congresso Internacional sobre a Luz, em 1932, Coblentz propôs a divisão do UV em três regiões: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm), e UVC (< 280 nm) (LIM; DRAELOS, 2009). Enquanto isso, na Alemanha, em 1956, Schulze propôs um teste para os filtros comercialmente disponíveis, dando-lhes um fator de proteção (LIM; DRAELOS, 2009). O fator de proteção foi obtido dividindo o tempo de exposição necessário para induzir eritema com filtro solar pelo tempo de exposição necessário sem filtro. Isto foi feito pela aplicação de uma série de doses UV crescentes (aumento de 40%) em ambas as peles protegidas e não protegidas. Em 1974, Greiter, na Áustria, popularizou e melhorou o conceito de fator de proteção solar (FPS) (LIM; DRAELOS, 2009).

Em 1978, a *Food and Drug Administration* (FDA), nos EUA, publicou o registo federal com as diretrizes para formular e avaliar filtros solares (LIM; DRAELOS, 2009). Este método foi aceito internacionalmente. Os filtros então, não eram somente usados para prevenir a queimadura solar, mas para prolongar o tempo de exposição para o bronzeamento. Nesse contexto, começou a haver uma certa preocupação que os filtros solares poderiam causar uma falsa percepção de segurança aos consumidores, levando a uma exposição prolongada à radiação UV (LIM; DRAELOS, 2009).

Em 1994, a *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA), introduziu novas técnicas para caracterizar e especificar o espectro de emissão da fonte de UV e designou os tipos de pele com base na cor da pele (COLIPA, 1994). A COLIPA, juntamente com autoridades do Japão e da África do Sul, começou a discutir uma harmonização do método de avaliação do FPS em 2000, chegando a um acordo conjunto entre o método de ensaio internacional FPS em outubro de 2002, e atualizado em 2006 pelas indústrias europeias, japonesas, americanas e sul-africanas (HERZOG, 2002).

Em 2007, a FDA publicou a Proposta Final de Regras sobre filtros solares (FDA, 2007), sendo que uma das mudanças propostas é de FPS ser um acrônimo de "fator de proteção de *queimaduras solares*" (que antes era um acrônimo de fator de proteção solar), e propôs-se a um limite máximo para o FPS de 50+, em oposição à proposta anterior de 30+. Além disso, pela primeira vez, a FDA também propôs a avaliação e a rotulagem de proteção UVA dos protetores solares, usando uma combinação de testes *in vitro* (Razão de absorbância UVA1/UV) e *in vivo* Pigmentação Persitente (*persistent pigment darkening* - PPD).

Em junho de 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos (ANVISA, 2012), que definiu alguns parâmetros a serem adotados para novos protetores solares, entre eles: apresentar FPS mínimo de 6; apresentar Fator de Proteção UVA cujo valor corresponda a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem e o termo “bloqueador solar” não é mais permitido.

Atualmente, esses conceitos que foram determinados por diversos órgãos reguladores, já são bem conhecidos. O FPS, determinado *in vivo,* é conhecido como um indicador universal da eficácia de filtros solares contra a queimadura solar, sendo definido como o *“valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEnp)”* (ANVISA, 2012), sendo que Dose Mínima Eritematosa (DME) é “*dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta”* (de acordo com a metodologia adotada) e Dose Mínima Pigmentária (DMP) é 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*” (ANVISA, 2012).

Já para a determinação da proteção UVA, utilizam-se outras metodologias, uma vez que o FPS não é capaz de prever a proteção UVA, sendo a metodologia *in vivo* da

Pigmentação Persistente (PPD - *Persistent Pigment Darkening*), a qual mede a pigmentação da pele de voluntários 2 horas após a irradiação por UVA, a mais utilizada e preconizada por órgãos regulatórios. Entretanto este teste apresenta uma desvantagem, que é a exposição do voluntário a altas doses de radiação UVA (LIM; DRAELOS, 2009).

Dentre outros métodos utilizados para a triagem de formulações estão a determinação da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico (Diffey, 1994) os quais são medidas relativas do espectro de absorção do fotoprotetor. Em relação ao comprimento de onda crítico, os fotoprotetores são agrupados em cinco categorias, visto que a categoria de maior proteção UVA é atingida com o comprimento de onda crítico superior a 370 nm (DIFFEY, 1994). A razão UVA/UVB é amplamente utilizada para a medida da fotoestabilidade, já que se trata de um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo (CHATELAIN; GABARD, 2001; HERZOG et al., 2002). Entretanto, para o registro dos fotoprotetores, somente são aceitos os métodos de avaliação de FPS e PPD em humanos (ANVISA 2012).

2.5.2. Segurança - Fototoxicidade

Durante muitos anos, os testes em animais foram a única ferramenta capaz de avaliar a segurança de matérias-primas e produtos cosméticos acabados antes do uso humano. Entretanto, muitos esforços foram feitos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais que fossem meios seguros para a avaliação da segurança de cosméticos.

Assim, desde o ano 2000, na Europa, os testes em animais, para a avaliação do potencial fototóxico agudo não são mais permitidos, uma vez que se chegou no consenso que o potencial fototóxico agudo pode ser bem avaliados por métodos *in vitro*, alternativos ao uso de animais. O teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3 (3T3 NRUPT: 3T3 - *Neutral Red Uptake – Phototoxicity Test*) é considerado o principal teste para esta avaliação, uma vez que apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de ser um teste validado (LIEBSCH et al., 2005).

Nesse teste, células 3T3 de Balb/c cultivadas em duas microplacas de 96 poços, são pré-incubadas com oito concentrações diferentes da substância química a ser analisada. Uma placa é então exposta à radiação UVA e a outra é mantida ao abrigo da luz, para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência de radiação para a posterior determinação da cito e fototoxicidade da substância (LIEBSCH et al., 2005).

O 3T3 NRU PT foi validado com sucesso entre 1992 e 1998 (SPIELMANN et al., 1994; SPIELMANN et al., 1998), foi aceito para fins regulatórios por parte da União

Européia no ano de 2000, pela OECD em 2002, e pela FDA dos EUA em 2003 (LIEBSCH et al., 2005).

2.5.3. Estabilidade

Com o grande número de formulações fotoprotetoras e multifuncionais, contendo filtros solares, presentes no mercado, cresce a necessidade da determinação da fotoestabilidade dos filtros solares. Esses métodos de análise são empregados no desenvolvimento de um novo fotoprotetor, no estudo de estabilidade e, ainda como ferramenta para o controle de qualidade de tais formulações, uma vez que os produtos de degradação produzidos podem levar a efeitos tóxicos ou alérgicos na pele (GRANGER; BROWN, 2001).

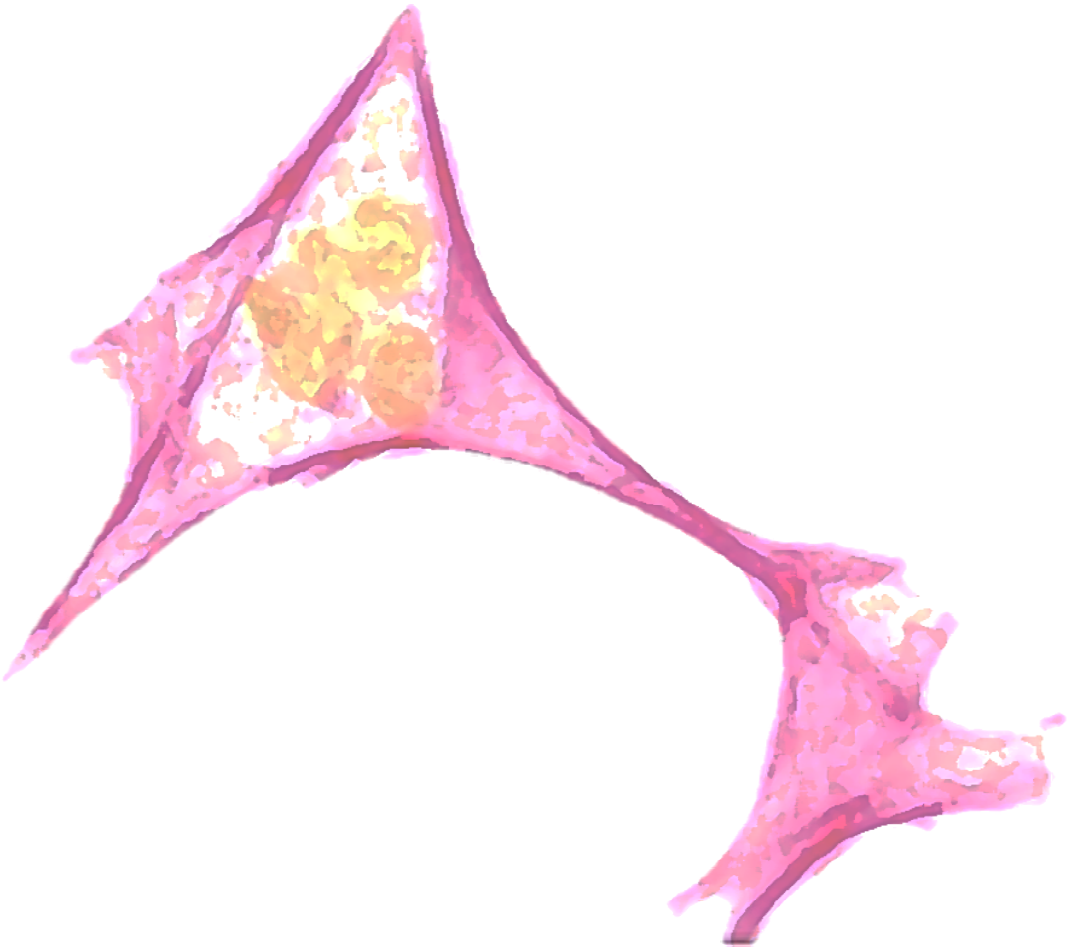
Os estudos nesse campo são necessários para conhecer os filtros solares passíveis de degradação e que necessitam ser estabilizados, além de prever os efeitos do meio na estabilidade química, no prazo de validade e nas condições adequadas de estocagem. Além disso, considerando que os fotoprodutos podem causar fotoalergia ou fototoxicidade, a realização destes testes torna-se de fundamental importância durante a escolha dos componentes e do tipo de formulação (RIEGER, 1997; SCHRADER; JAKUPOVIC; BALTES, 1994; GERHARD; NOHYNEK; SCHAEFERY, 2001; BUTT; CHRISTENSEN, 2000), a fim de garantir ao consumidor uma formulação fotoprotetora segura para o uso.

As reações que ocorrem com as moléculas dos filtros solares podem, além de levar à perda da eficácia dos fotoprotetor, podem levar à formação de subprodutos tóxicos ou alérgicos, o que é indesejável. Nesse sentido, os formuladores tentam desenvolver associações de filtros solares fotoestáveis, ou seja, formulações que contenham filtros solares que se mantenham estáveis após a exposição à radiação UV.

Dessa forma, diversos estudos sobre a fotoestabilidade têm sido realizados, geralmente utilizando-se de técnicas *in vitro*, como por exemplo, a espectrofotometria (KAMMEYER, et al., 1987; DEFLANDRE; LANG, 1988; BERSET et al., 1996; MARGINEAN LAZAR et al., 1997), ou de técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DEFLANDRE; LANG, 1988; BERSET et al., 1996; MARGINEAN LAZAR et al., 1997) e a cromatografia gasosa (CG) (ROSCHER et al., 1994), sendo que ambos os métodos devem ser realizados paralelamente, pois, se por um lado a análise espectrofotométrica pode ser afetada por artefatos ópticos, tais como fotoprodutos que também absorvem a radiação UV, por outro, as técnicas de separação não possibilitam, por sua vez, a quantificação dos

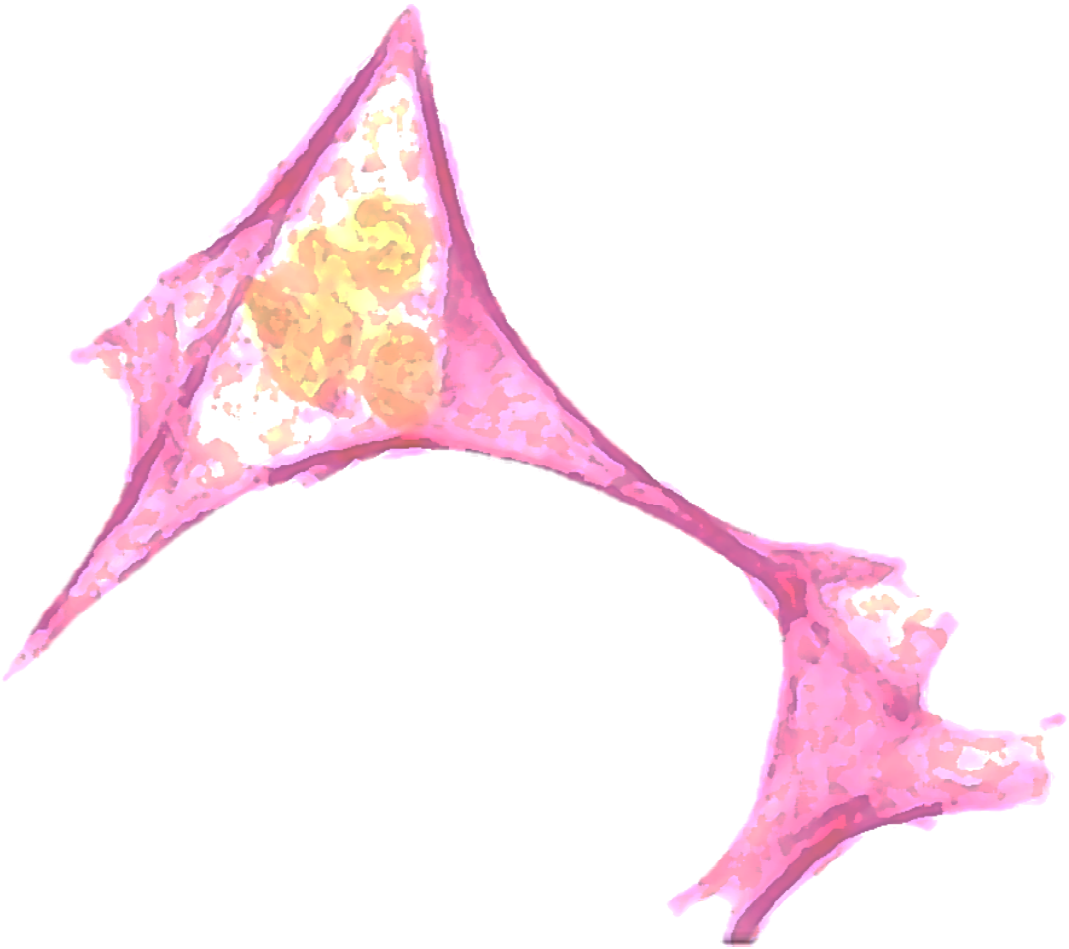
efeitos de alterações foto-induzidas, e seus efeitos em relação à fotoproteção (STOKES; DIFFEY, 1999).

Além desses, outro método muito utilizado para a avaliação da estabilidade de fotoprotetores é o estudo do comportamento reológico, por meio da análise de alterações da viscosidade, índice de fluxo e tixotropia, as quais têm grande relevância durante o desenvolvimento de formulações, pois, além de monitorar a estabilidade, fornecem informações importantes em relação à performance dos produtos durante sua aplicação na pele. Além de fato de que a reologia pode interferir no escoamento do produto durante o processo de fabricação e na estabilidade física do mesmo (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).



3. Objetivo

O objetivo deste projeto foi a avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares e estabilizadores de filtros solares, associados ao retinol e ao palmitato de retinila, por meio do uso de CLAE e cultura de fibroblastos, respectivamente.



4. Material e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias-primas e reagentes

As matérias-primas utilizadas nas formulações foram descritas de acordo com a nomenclatura INCI *(International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) e com a denominação comum internacional (*International Non-proprietary Name*) fornecida pela Comissão das Comunidades Europeias (2006) e, quando necessário, também está descrito o nome comercial e o fornecedor.

- Ácido acético glacial;
- Água destilada e deionizada;
- Álcool etílico;
- Álcool isopropílico, grau HPLC;
- Álcool isopropílico, PA;
- Álcool metílico, grau HPLC;
- Avobenzona (nomenclatura INCI: BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, denominação química/IUPAC: 1-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona, denominação INN: avobenzona) - Neo heliopan 357 Symrise;
- Bemotrizinol (nomenclatura INCI: BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, denominação química/IUPAC: 2,2′-[6-(4-methoxyphenyl)- 1,3,5-triazine-2,4-diyl] bis{5-[(2-ethylhexyl)oxy]phenol}, denominação INN: bemotrizinol) – Tinosorb S - BASF;
- Benzoato de alquila C12-15 – Crodamol AB - Croda;
- Benzofenona-3 (nomenclatura INCI: BENZOPHENONE-3, denominação química/IUPAC: 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, denominação INN: oxibenzona) - Neo heliopan BB - Symrise;
- Benzotriazolil dodecil p-cresol (nomenclatura INCI: BENZOTRIAZOLYL DODECYL P-CRESOL, denominação química/IUPAC: 2-(2H-Benzothiazol-2-yl)-6-(dodecyl)-4-methylphenol) – Tinogard TL - BASF;
- BHT;
- Cera autoemulsificante base fosfato (Álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato de cetet-10) - Crodafos CES - Croda;
- Ciclometicone volátil - DC 245 - Dow Corning.
- Corante vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) cod 1.01369.0025, Merck;

- Dietilexilnaftalato (nomenclatura INCI: DIETHYLHEXYL 2,6 NAPHTHALATE, denominação química/IUPAC: Dioctyl 2,6-Naphthalate) – Corapan TQ - Symrise;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Fenoxietanol e parabenos – Undebenzofene-C ;
- Glicerina, PA;
- Hidroxietilcelulose – Natrosol, Aqualon;
- L-Glutamina, código G7513, Sigma;
- L-histidina, cod H8000-100G, Sigma;
- Meio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Médium), cod BR 30003-05, LGC Biotecnologia
- Metoxicinamato de etil-hexila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, denominação química/IUPAC: 4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo) - Neo heliopan AV - Symrise;
- Miristato de poligligerila, fenilmeticona, trietilexanoína - Net FS, Nikko Chemicals;
- Norfloxacina, cod N9890-1G, Sigma;
- Octocrileno (nomenclatura INCI: OCTOCRYLENE, denominação química/IUPAC: ácido 2-propenóico, 2-ciano-3,3-difenil-, éster 2-etil-hexílico, denominação INN: octocrileno) - Neo heliopan 303 - Symrise;
- dPBS com Ca2+ e Mg2+ cod BR30264-05, LGC Biotecnologia;
- dPBS sem Ca2+ e Mg2+ cod BR30013-05, LGC Biotecnologia;
- Penicilina – Streptomicina, cod A5955, Sigma;
- Propilenoglicol, PA;
- Soro bovino fetal; código 12657029, Invitrogen;
- Tripsina, cod T4174, Sigma.

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador, Heidolph, RZR 2021;
- Balança analítica, Ohaus, modelo AS 200;
- Balança eletrônica, Marte, modelo AS 2000;
- Banho-maria, Mod 100, Fanem;
- Cabine de Segurança Biológica Classe II, PA 400, Pachane;
- Centrífuga 5810 R, Eppendorf;
- Centrífuga Centribio modelo 80 – 2B;

- Cromatógrafo líquido, marca Shimadzu, acoplado a 2 bombas e detector UV com arranjo de diodo, em coluna de fase reversa, C18 (Restek® C18, 250mm, 5µm);
- Espectrofotômetro Hitachi U-2001;
- Estufas para cultura bacteriológica, Olidef, modelo ECB de 45ºC;
- Frascos de cultura de células de 75cm^2;
- Incubadora de CO_2, Forma Series II Water-Jacket, Thermo Scientific;
- Incubadora shaker MA 420, Marconi;
- Lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) e detectada por um radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetector para a medida da radiação UVA (365 nm);
- Leitor de microplacas Biotek Synergy 2
- Microplacas de poliestireno com fundo chato com tampa de 96 poços;
- Microscópio invertido 13742 NIB-6, Coleman ;
- Peagômetro Digimed modelo DM20;
- Pipetador Automático;
- Pipetas automáticas;
- Radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA (365 nm) e da radiação UVB (312 nm);
- Simulador solar de 150W, que consiste de uma lâmpada de arco de xenônio de 150W 96000 (Oriel Corporation, Stratford, CT), ligada a uma fonte. Espelho dicróico 81045 Oriel (para filtrar as radiações com comprimentos de onda inferiores a 280nm e superiores a 400nm), e filtro 59450 Oriel (para bloquear os comprimentos de onda UVC);
- Tubos Falcon de 15mL e de 50mL;
- Vidrarias em geral.

4.2. Métodos

4.2.1. Elaboração das formulações

O desenvolvimento das formulações foi realizado com base em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Dessa maneira, foi elaborada uma formulação à base de álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato de cetet-10 (cera autoemulsificante base fosfato), Miristato de poligligerila, fenil meticona, trietilexanoína, glicerina e água (Net FS, Nikko

Chemicals) e hidroxietilcelulose e de duas associações de filtros solares com FPS 15 comprovado (GASPAR et al., 2006), uma considerada mais fotoestável (Formulação 1) e outra considerada menos fotoestável (Formulação 5) (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2004, 2006). A seguir, as formulações 1 e 5 foram acrescidas de 3 outras matérias-primas, benzotriazolil dodecil p-cresol (Tinogard® TL, BASF) (Formulações 2 e 6, respectivamente), dietilexilnaftalato (Corapan® TQ, Symrise) (Formulações 3 e 7, respectivamente) e bemotrizinol (Tinosorb® S, BASF) (Formulações 4 e 8, respectivamente) descritos como estabilizadores de filtros solares, sendo que esse último também é utilizado como filtro solar (CHATERLAIN; GABARD, 2001) (Tabela 1). A seguir, essas formulações foram ainda acrescidas de 0,4% de retinol (1.540.000 UI/g) (Retinol 50C®, Basf) (F1Ret, F2Ret, F3Ret, F4Ret, F5Ret, F6Ret, F7Ret, F8Ret) ou de 0,35% de palmitato de retinila (1.700.000 UI/g) (DSM, Suíça) (F1Pr, F2Pr, F3Pr, F4Pr, F5Pr, F6Pr, F7Pr, F8Pr), para avaliar a influência dessas matérias-primas na fotoestabilidade das formulações em estudo.

Tabela 1 – Formulações

Matérias-primas	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Hidroxietilcelulose	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Miristato de poligligerila, fenilmeticona, trietilexa noína	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Glicerina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Propilenoglicol	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Cera autoemulsificante base fosfato	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Benzoato de alquila C12-15	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Metoxicinamato de etil-hexila	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Octocrileno	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Benzofenona–3	4,00	4,00	4,00	4,00	-	-	-	-
Avobenzona	-	-	-	-	2,00	2,00	2,00	2,00
Benzotriazolil dodecil p-cresol	-	0,05	-	-	-	0,05	-	-
Dietilexilnaftalato	-	-	5,00	-	-	-	5,00	-
Bemotrizinol	-	-	-	3,00	-	-	-	3,00
Água qsp.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

4.2.2. Testes preliminares de estabilidade

As formulações em estudo foram submetidas a testes preliminares de estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual diária durante 7 dias quando mantidas no ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 45ºC. No teste de centrifugação, 5 gramas de cada amostra objeto de estudo foram centrifugados a 3000rpm, por 30 minutos em centrífuga Centribio modelo 80 – 2B. A medida de pH foi realizada em peagômetro Digimed modelo DM20, utilizando-se amostras das formulações em estudo, diluídas em água destilada (10%). As medidas foram realizadas no tempo zero e 7 dias, sendo que as amostras foram previamente armazenadas no ambiente e a 45°C. Na avaliação visual foram consideradas as seguintes alterações: cor, separação de fases, homogeneidade, quando armazenadas no ambiente e a 45°C (ANVISA, 2004).

4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores

O estudo de fotoestabilidade foi realizado com todas as formulações em estudo, contendo as diferentes associações de filtros solares, estabilizadores e vitaminas por meio da determinação da concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas objeto de estudo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.3.1. Irradiação das formulações

Foram aplicadas, em lâminas de vidro, 40 mg das formulações e, após 15 minutos, estas foram expostas à radiação ultravioleta (UV), na faixa de 280 a 400 nm, durante 15 minutos, emitida por uma lâmpada de arco de xenônio de 300W 96000 (Oriel Corporation, Stratford, CT), ligada a uma fonte e acoplada a um espelho dicróico 81045 Oriel e a um filtro 59450 Oriel. A dose de radiação foi medida pelo radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA (365 nm) e da radiação UVB (312 nm).

A irradiância na região do UVA era de 15,2 mW/cm^2 e, na região do UVB, de 9,3mW/cm^2 o que resulta em uma dose de radiação UVA cumulativa de 13,68 J/cm^2, e de UVB de 8,37 J/cm^2. Para cada lâmina submetida à irradiação havia o seu controle negativo, ou seja, uma lâmina deixada ao abrigo da luz (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

4.2.3.2. Procedimento de extração

As lâminas (controle e expostas à radiação UV) foram imersas em aproximadamente 20mL de isopropanol para a dissolução do filme seco em ultra-som, sendo a solução

resultante filtrada e transferida para balão volumétrico de 25mL (BERSET et al., 1996, GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

Para a avaliação dos 4 filtros (benzofenona-3, octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila e avobenzona), foram usadas amostras não concentradas.

Entretanto, para a avaliação das vitaminas (palmitato de retinila e retinol), foi necessária a injeção de amostras concentradas dez vezes, uma vez que estas vitaminas apresentam baixo coeficiente de extinção e estão presentes na formulação em baixas concentrações, assim, os picos obtidos poderiam comprometer o método. Dessa forma, após o procedimento anteriormente descrito de extração, 3 mL da solução resultante foram transferidos para tubos cônicos e o solvente evaporado à temperatura ambiente, usando-se nitrogênio como gás de arraste. O resíduo obtido foi dissolvido em 0,3 mL de álcool isopropílico, sendo o soluto agitado durante 30 segundos em *mixer*.

4.2.3.3. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares por CLAE

As soluções resultantes foram submetidas à análise cromatográfica em cromatógrafo líquido, marca Shimadzu, acoplado a 2 bombas e detector UV com arranjo de diodo, em coluna de fase reversa, C18 (Restek® C18, 250mm, 5μm), usando eluição por gradiente para a determinação da concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas objeto de estudo (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

Foi realizada a padronização das condições cromatográficas, as quais estão descritas a seguir:

- Fase móvel (eluição por gradiente): o gradiente foi mantido isocrático por 53 minutos com 74% de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v) como solvente A e 26% de água como solvente B; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 4 minutos atingindo 0% de água (solvente B) e mantido isocrático durante 44 minutos
- Fluxo da fase móvel: 0,8mL min^{-1}
- Comprimento de onda de análise: 325nm
- Volume injetado de amostra: 20 μL

4.2.3.3.1. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e a exatidão/recuperação do método foram utilizados 40mg de amostra das formulações F3Pr e F8Ret que não foram irradiadas e foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 4.2.3.2.

Para a determinação da precisão e da exatidão/recuperação intra-ensaio, foram avaliadas, em quintuplicata, em um mesmo dia, amostras das formulações F3Pr e F8Ret e para a determinação da precisão e da exatidão/recuperação inter-ensaio, foram avaliadas, em triplicata, em 3 dias consecutivos, as amostras das mesmas formulações.

As concentrações dos filtros solares e vitaminas nas amostras, obtidas a partir das curvas analíticas, foram utilizadas para o cálculo da variação entre as medidas (ANVISA, 2003), de acordo com a equação abaixo:

$$CV = \frac{S \cdot 100}{\overline{X}} \qquad (1)$$

A exatidão/recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003):

$$E = \frac{concentração \quad experimental}{concentração \quad teórica} \cdot 100 \qquad (2)$$

4.2.3.4. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

Após o procedimento de extração descrito no item 4.2.3.2., as soluções resultantes foram diluídas (1:10) e analisadas em espectrofotômetro Hitachi U-2001 na faixa de 200 a 400nm. Foi determinado o espectro de absorção e a área sob a curva (integral do espectro de absorção) das amostras na faixa do UVB (280-320 nm) e do UVA (320-400 nm) e obtida a razão entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA/UVB (DIFFEY, 1994; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

4.2.3.5. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos nos estudos de fotoestabilidade foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que a maioria das amostras apresentava distribuição não normal.

4.2.4. Avaliação da Fototoxicidade

O potencial fototóxico dos 4 filtros solares (metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, benzofenona–3, avobenzona), 3 estabilizadores (benzotriazolil dodecil p-cresol, dietilexilnaftalato, bemotrizinol) e 2 vitaminas em estudo (retinol e palmitato de retinila), tanto isoladamente quanto em associação, foi determinado por meio do teste em cultura de fibroblastos 3T3 NRU PT. Para tal, inicialmente as substâncias foram diluídas em DMSO e foram realizadas 8 diluições geométricas sucessivas em DPBS, com um fator de diluição constante (1.47), sendo que a concentração final de DMSO não excedeu 1%. Assim, as 8 concentrações estudadas para as substâncias isoladas foram de 6.8, 10, 14.7, 21.5, 31.6, 46.4, 68.1 e 100 µg/mL.

Também foram analisadas as 8 diferentes associações em estudo, contendo a mesma proporção dos filtros solares utilizada nas formulações em estudo, conforme apresentado na Tabela 1 do item 4.2.1. Foram ainda analisadas as diferentes associações dos filtros solares na presença de retinol e palmitato de retinila. Para as associações também foi utilizado o fator de diluição constante de 1.47. Assim, as 8 concentrações estudadas para as associações em estudo foram de 6.8, 10, 14.7, 21.5, 31.6, 46.4, 68.1 e 100 µg/mL. Os estudos foram realizados em duplicata.

4.2.4.1. Linhagem celular de fibroblastos 3T3

Foi utilizada uma cultura de fibroblastos linhagem Balb 3T3, clone 31, ATCC (*American Type Culture Collection*), a qual foi utilizada no estudo de validação do método realizado pela Comunidade Européia (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998).

As culturas foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dubelcco) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 4mM de glutamina, 100 UI de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C, em estufa de CO_2 com controle de umidade.

4.2.4.2. Fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo INVITTOX nº 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998). Para tal, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo Balb/C 3T3 clone 31 ATCC, conforme apresentado no item 4.2.4.1. As características dos fibroblastos nas diversas etapas do estudo, a sua viabilidade frente a radiação UV e a captação

do corante vermelho neutro foram monitorados por Microscópio biológico binocular invertido.

Previamente ao início dos estudos, foi avaliada a sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA. Para tal, foram avaliadas cinco diferentes doses de radiação UVA: 3, 5, 9 e 16 J/cm², o que equivale a 17, 28, 50 e 89 minutos de exposição à radiação UVA de 3 mW/cm^2, emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) e detectada por um radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetector para a medida da radiação UVA (365 nm).

Após a avaliação da sensibilidade das células à radiação, foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Para tal, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura (1×10^5 células/mL) e, a seguir, foram inoculados 100µL dessa suspensão (1×10^4 células) em 60 poços centrais de cada microplaca. Os 36 poços laterais das microplacas foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para a determinação da citotoxicidade (na ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2, para a formação de uma monocamada semiconfluente. A seguir as células foram decantadas, separadas do meio de cultura e cada poço foi lavado com DPBS (tampão fosfato modificado por Dubelcco contendo cálcio).

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100µL de 8 diferentes concentrações de cada substância em estudo diluídos em DMSO / DPBS: metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, benzofenona-3, avobenzona, benzotriazolil dodecil p-cresol, dietilexilnaftalato e bemotrizinol, palmitato de retinila e retinol, de acordo com o modelo apresentado na Figura 16. Cada experimento foi realizado em duplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
C	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
D	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
E	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
F	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
G	b	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	b
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Figura 16. Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade
CNT = Controle não tratado (contendo células, porém sem nenhuma substância teste); b = branco, contendo DPBS (não contém células, porém tratada com meio vermelho neutro e solução de dessorção).

As 2 microplacas foram incubadas por 1h e, a seguir, uma delas foi submetida à radiação UVA de 3 mW/ cm^2 por 28 minutos, emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 o que equivale a uma dose total de 5 J/cm^2 de radiação UVA, para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com DPBS, o meio de cultura foi reposto e as microplacas incubadas a 37°C por 20h. A seguir, 100µL de meio DMEM contendo uma solução de 50 µg/mL do corante vital vermelho neutro foi adicionada em cada poço e as células incubadas por 3 h a 37°C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por água / etanol / ácido acético foi acrescentada em cada poço.

Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi realizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm em leitor de microplacas Biotek Synergy 2, e os dados analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo ZEBET, Alemanha) para o

cálculo do PIF (“photo irritation factor” - fator de fotoirritação) - e do MPE (“mean photo effect” – foto efeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico.

O cálculo do PIF está relacionado com a EC50, ou seja, à concentração de cada substância que inibe 50% da viabilidade celular da placa não irradiada e da placa irradiada, como apresentado na equação a seguir:

$$PIF = \frac{EC_{50}(-Irr)}{EC_{50}(+Irr)} \qquad (3)$$

O cálculo do MPE é baseado na comparação das curvas dose-resposta completas, como apresentado na equação a seguir:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i} \qquad (4)$$

Em que, o foto efeito (PEci) em qualquer concentração (C) é definido como o produto do efeito resposta (REc) e do efeito dose (DEc), ou seja, PEci = REc x DEc. O efeito resposta (REc) é a diferença entre as respostas observadas na ausência e na presença de radiação, ou seja, REc = Rc(-Irr) – Rc (+Irr).

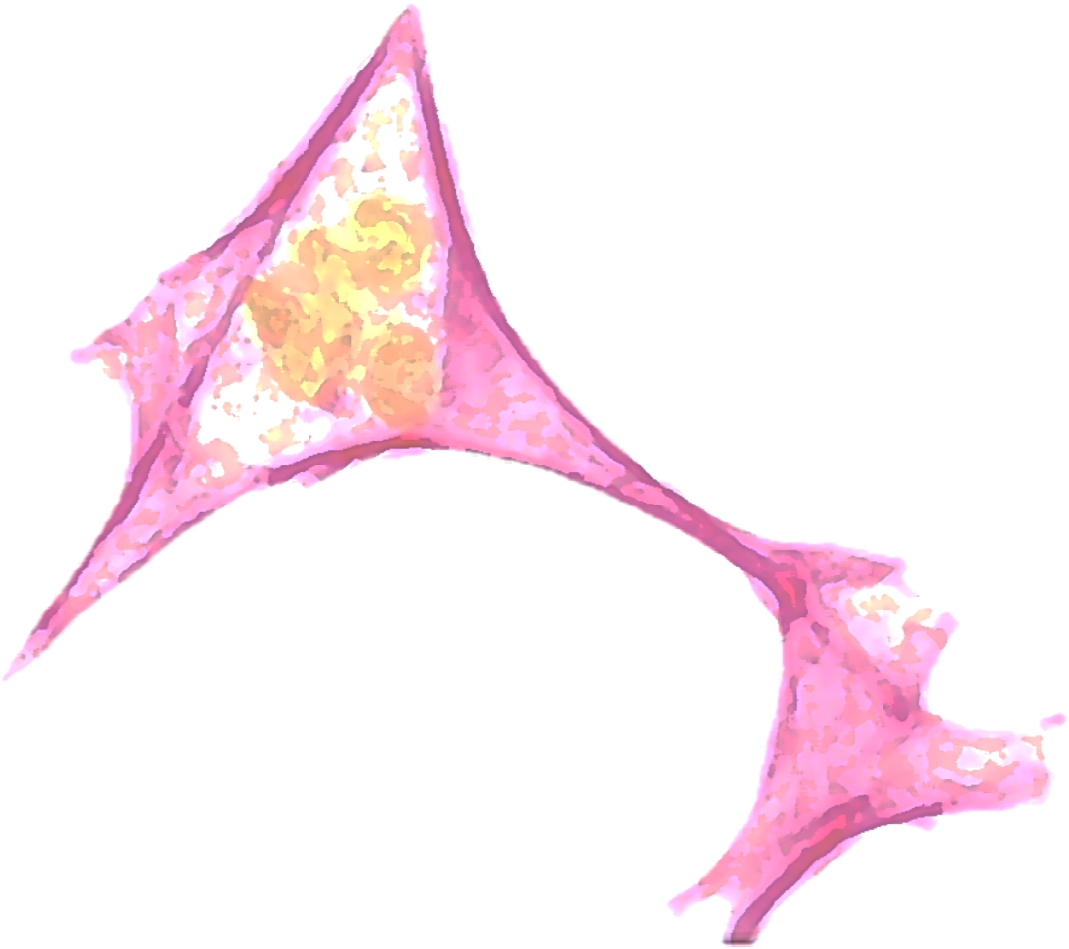
Modelo de Predição:

De acordo com o guia de determinação de fototoxicidade número 432 da OECD (2004), uma substância que apresenta:

PIF < 2 ou MPE < 0.1 prediz: “nenhuma fototoxicidade”,

PIF >2 e < 5 ou MPE > 0.1 e < 0.15 prediz: “provavelmente fototóxico” e

PIF > 5 ou MPE > 0.15 prediz: “fototóxico”.



5. Resultados

5.1 Testes preliminares de estabilidade

Após a centrifugação, todas as amostras apresentaram o mesmo padrão de manutenção do aspecto da formulação, sem haver separação das fases, sendo consideradas estáveis neste teste preliminar de estabilidade.

Após 7 dias, tanto as amostras mantidas no ambiente quanto as submetidas a 45ºC foram aprovadas pelo teste de avaliação visual, já que não houve alterações significativas nas formulações analisadas quando foram considerados os parâmetros cor, separação de fases e homogeneidade.

O pH das formulações foi ajustado logo após o preparo, de maneira que o valor final estava no intervalo de 5,8 a 6,2. Em relação à avaliação do pH após sete dias de estocagem observou-se que não houve alterações significativas durante o período de análise, tanto quando as formulações foram mantidas no ambiente quanto quando submetidas a 45ºC, praticamente todas as formulações apresentaram pH levemente ácido, na faixa de 5,0 a 6,6.

Assim, de acordo com os testes de estabilidade, as formulações foram consideradas estáveis, uma vez que não houve grandes mudanças nos parâmetros analisados.

5.2. Estudo da fotoestabilidade das formulações

5.2.1. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas por CLAE

5.2.1.1. Padronização do método de CLAE

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados objetivando-se a padronização das condições cromatográficas para a separação e análise dos 3 filtros solares, 2 estabilizadores de filtros solares e 2 vitaminas objeto de estudo.

Inicialmente, baseando-se nos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007), foram empregadas diferentes fases móveis para melhorar a resolução dos picos das substâncias em estudo e possibilitar a quantificação simultânea das mesmas. As fases móveis avaliadas foram: eluição por gradiente, sendo que, inicialmente, o gradiente foi mantido isocrático por 4 minutos com 84% de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v) como solvente A e 16% de água como solvente B; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 4 minutos atingindo 0% de água (solvente B) e mantido isocrático durante 44 minutos. Também foram utilizadas eluições por gradiente que iniciavam com uma eluição constante por 7 e 13 minutos de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (84:16), 13 e 23 minutos de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (82:18), 23 minutos de uma mistura

metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (81:19), 23 minutos de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (79:21), 23 minutos de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (77:23), 23, 33, 43 e 53 minutos de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v): água (74:26).

A partir dos resultados obtidos pôde-se verificar que a fase móvel que apresentou uma melhor resolução de todos os picos das substâncias em estudo (Figura 17 e 18A) foi a eluição por gradiente em que, inicialmente, o gradiente foi mantido isocrático por 53 minutos com 74% de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v) como solvente A e 26% de água como solvente B; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 4 minutos atingindo 0% de água (solvente B) e mantido isocrático durante 44 minutos.

Os cromatogramas abaixo se referem aos padrões de todas as substâncias analisadas, separadamente (Figura 17A a 16H), e todos em uma mesma solução (Figura 18A), ao branco de reagente (Figura 18B) e ao veículo (Figura 18C).

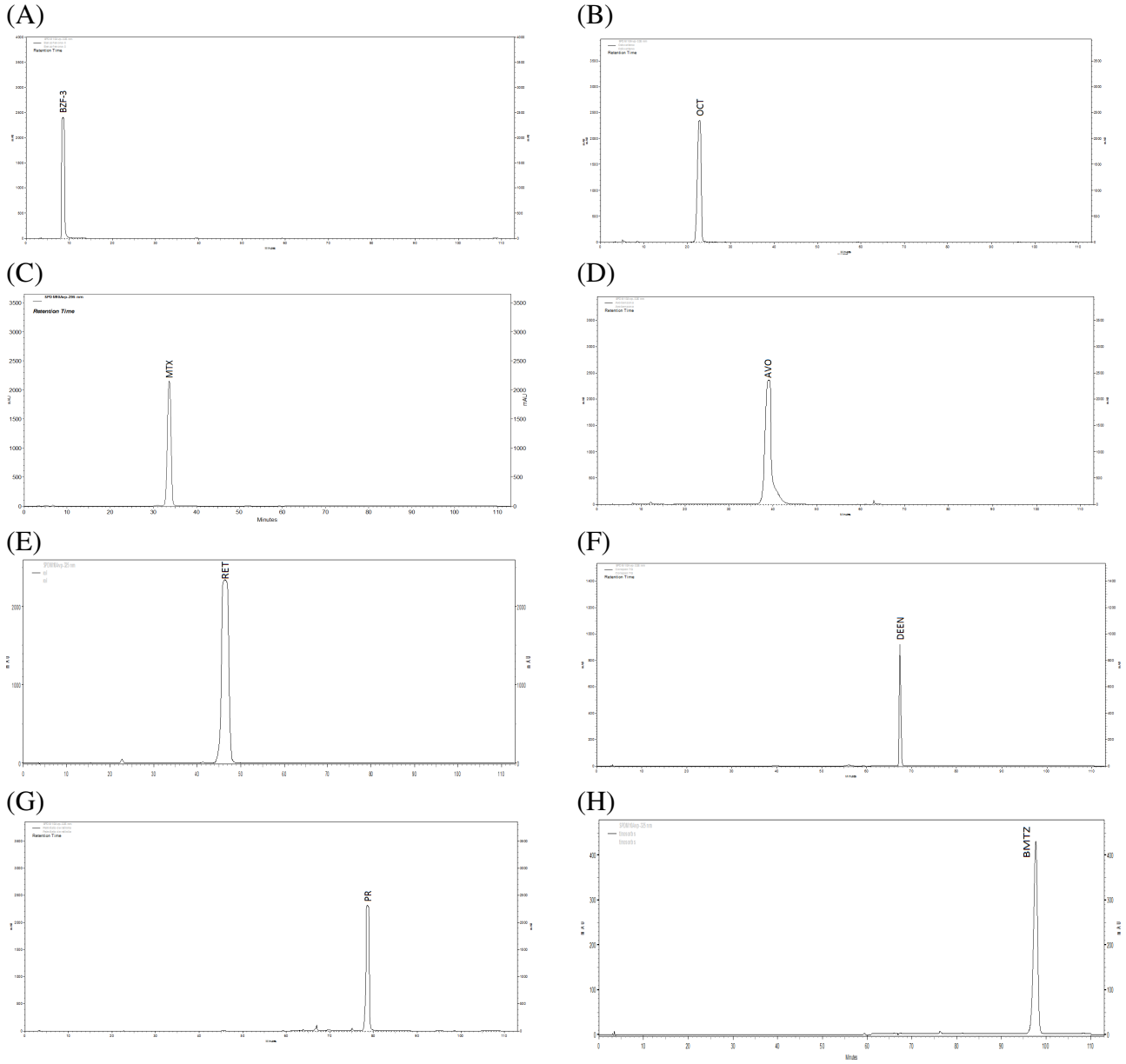
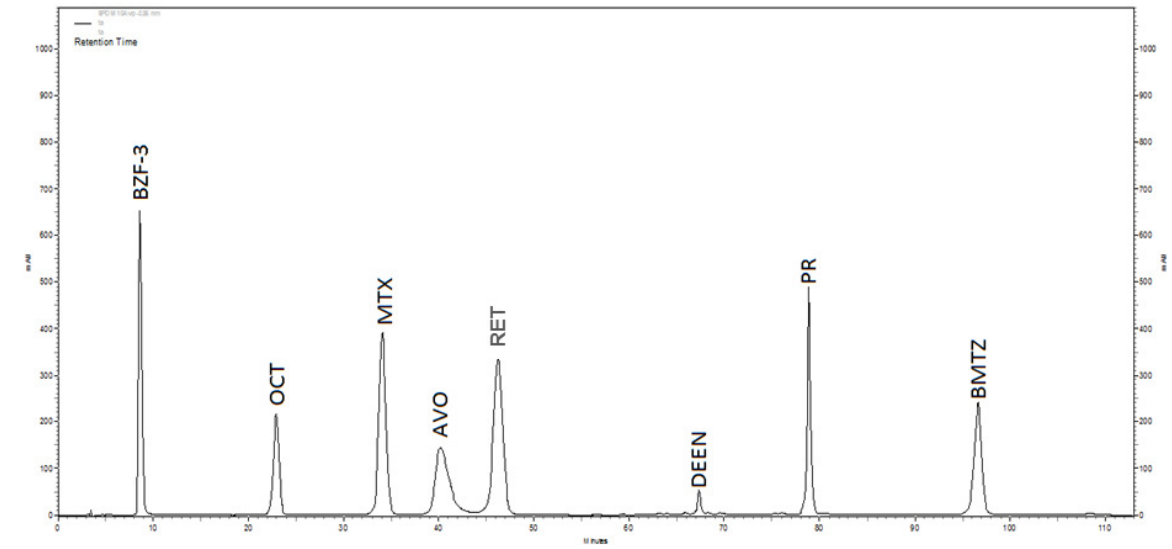
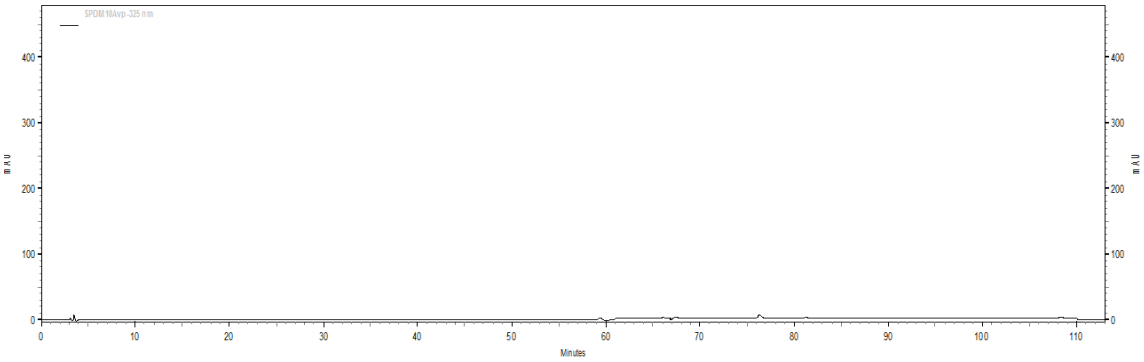


Figura 17. Cromatogramas dos padrões de todas as substâncias analisadas. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (5 µm) 25 cm, detecção: UV 325 nm, temperatura ambiente, fluxo 0,8 mL.min^{-1}. Substâncias identificadas: **A:** benzofenona-3 (BZF-3); **B:** octocrileno (OCT), **C:** metoxicinamato de etil-hexila (MTX); **D:** avobenzona (AVO), **E:** Retinol (RET), **F:** dietilexilnaftalato (DEEN); **G:** palmitato de Retinila (PR); **H:** bemotrizinol (BMTZ).

A)



B)



C)

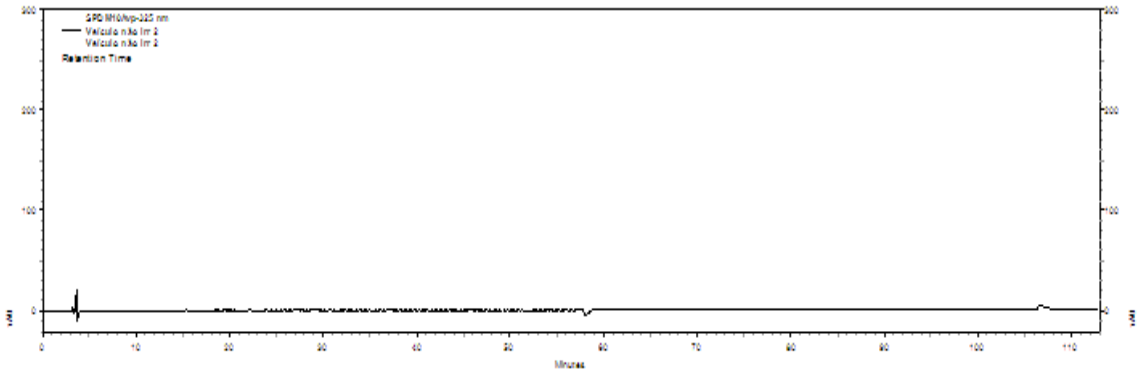


Figura 18. Cromatogramas: **A:** Cromatogramas dos padrões de todos os filtros solares e vitaminas analisados. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C18 (5 µm) 25 cm, detecção: UV 325 nm, temperatura ambiente, fluxo 0,8 mL.min^{-1}. Picos: benzofenona – 3 (BZF-3), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), retinol (RET), dietilexilnaftalato (DEEN), palmitato de retinila (PR), bemotrizinol (BTZ). **B:** branco de reagente. **C:** veículo.

Segundo estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, o benzotriazolil dodecil p-cresol não absorve no comprimento de onda utilizado, portanto não será quantificado no presente projeto e, assim, não foi injetado no estudo de padronização das amostras isoladas.

5.2.1.2. Irradiação das formulações

Inicialmente, o método proposto para a irradiação das lâminas de vidro contendo 40 mg das formulações objeto de estudo teria duração de 30 minutos de exposição de UVA/UVB, a uma intensidade de 15,2 mW/cm^2 na região do UVA e de 9,3mW/cm^2 na região do UVB, de o que resulta em uma dose de radiação UVA cumulativa de 27,36 J/cm^2, e de UVB de 16,74 J/cm^2. No entanto, discutiu-se a possibilidade de reduzir este período para 15 minutos, a fim de reduzir o tempo de exposição ao UV e obter os mesmos resultados. Assim, foi realizada uma irradiação de 30 minutos (dose UVA: 27,36 J/cm^2 e UVB: 16,74 J/cm^2) e outra de 15 minutos (dose UVA: 13,68 J/cm^2 e UVB: 8,37 J/cm^2). As condições de extração foram idênticas para ambas, assim como a análise no CLAE.

Os cromatogramas obtidos mostraram que quando a lâmina foi irradiada por apenas 15 minutos a concentração dos filtros, estabilizadores e vitaminas foi proporcionalmente menor que a concentração dessas substâncias na lâmina irradiada por 30 minutos e, ainda, observou-se degradação significativa das vitaminas em estudo. Desta maneira, as irradiações posteriores foram todas realizadas por exposição 15 minutos à radiação UVA/UVB.

5.2.1.3. Curvas analíticas

As curvas analíticas, apresentadas a seguir foram elaboradas a partir dos dados obtidos pela análise das soluções de uso, obtidas a partir da solução estoque das substâncias em estudo (4000µg/mL). As diluições foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos permitiram a elaboração das curvas analíticas que estão representadas nas Figuras 19-26.

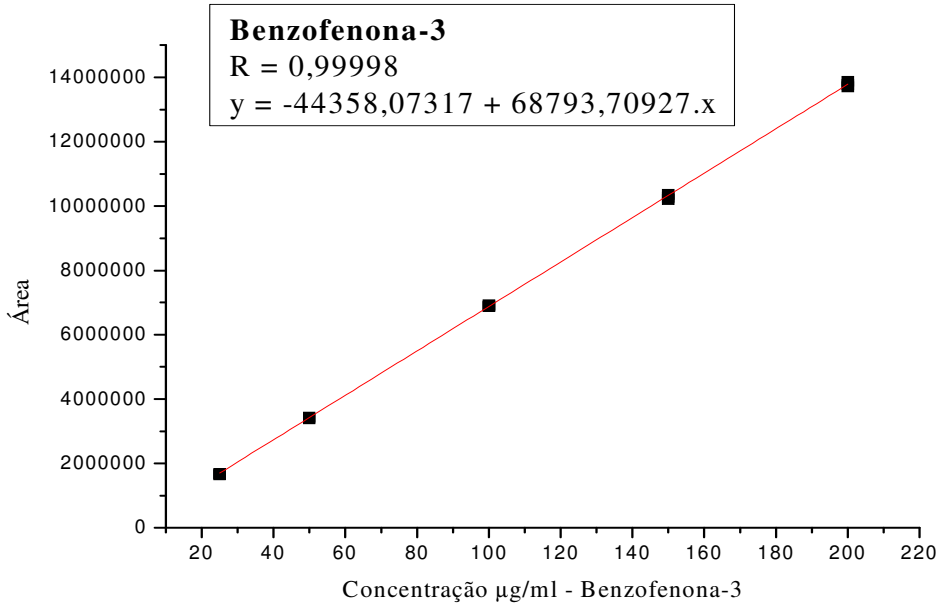


Figura 19: Curva analítica da benzofenona-3

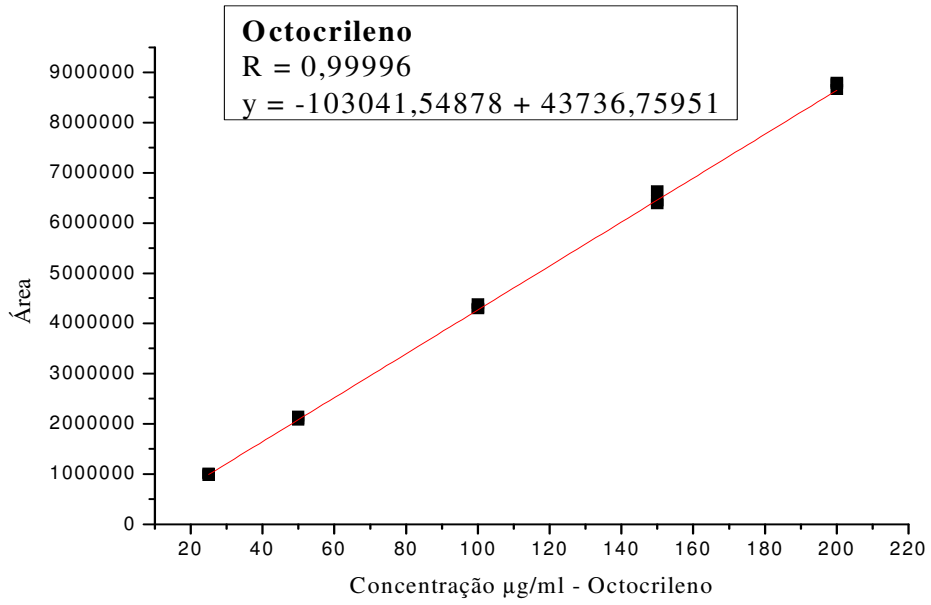


Figura 20: Curva analítica do octocrileno

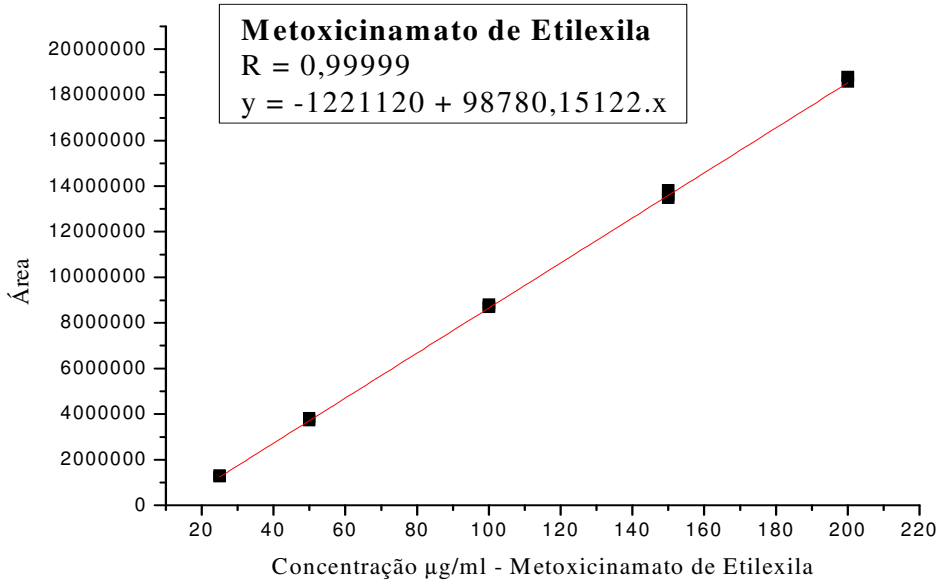


Figura 21: Curva analítica do metoxicinamato de etil-hexila

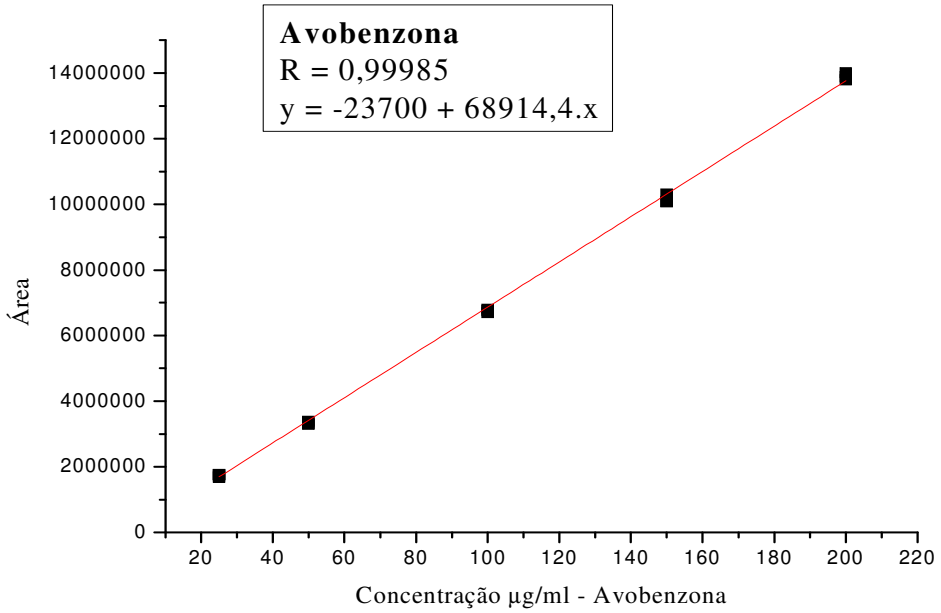


Figura 22: Curva analítica da avobenzona

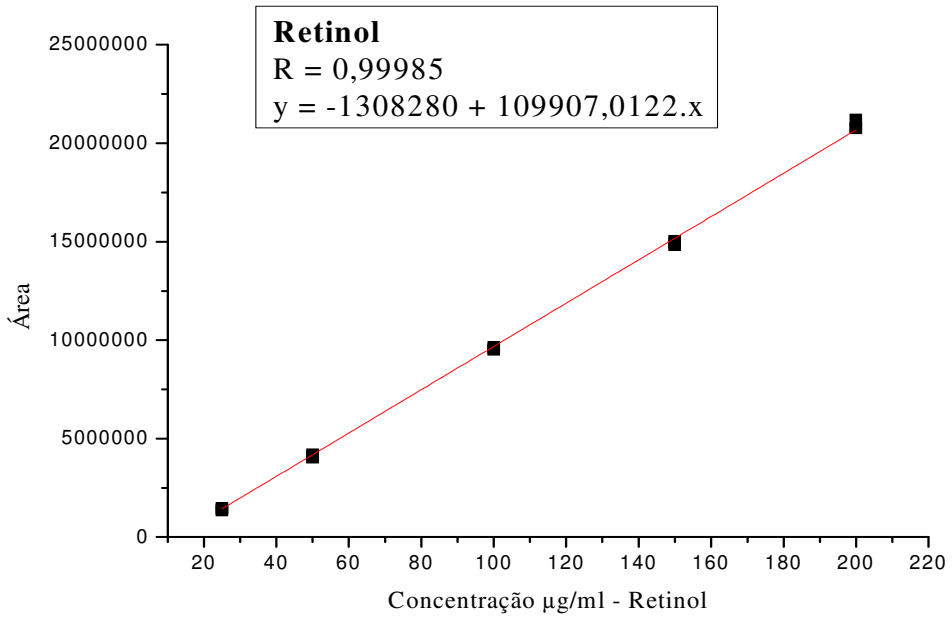


Figura 23: Curva analítica do retinol

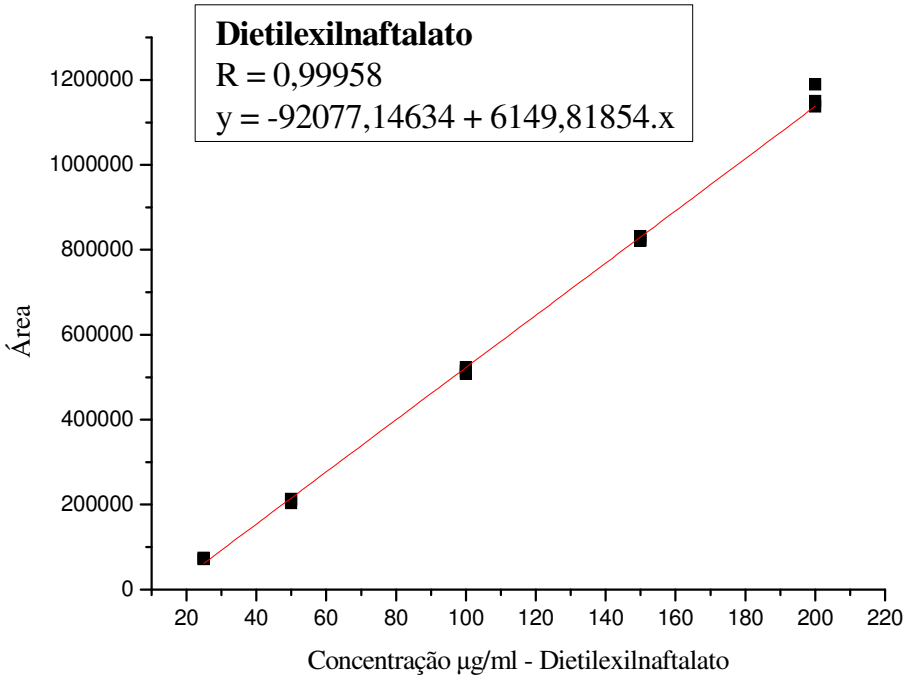


Figura 24: Curva analítica do dietilexilnaftalato

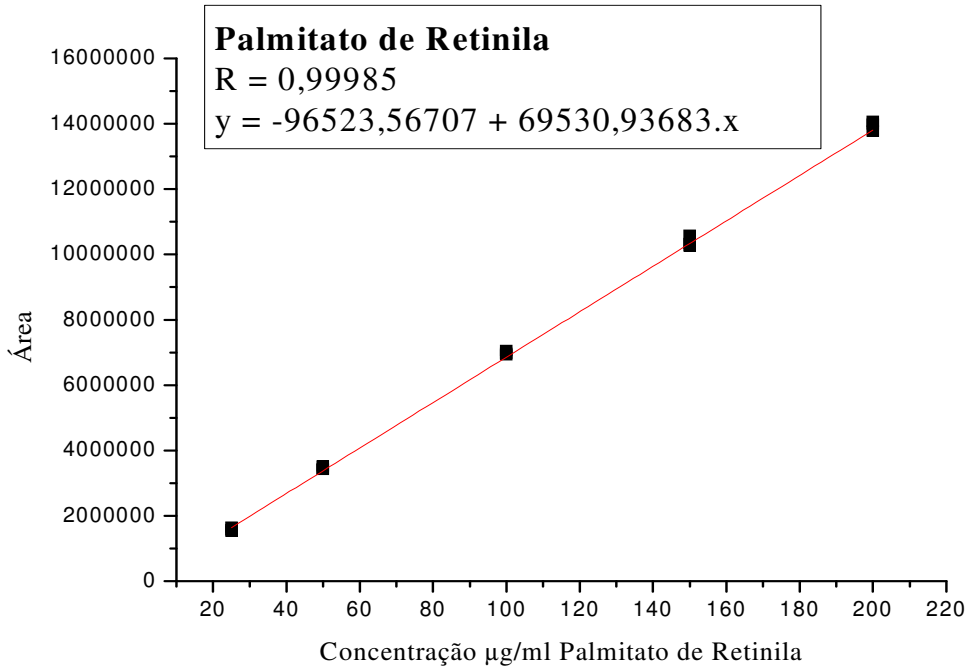


Figura 25: Curva analítica do palmitato de retinila

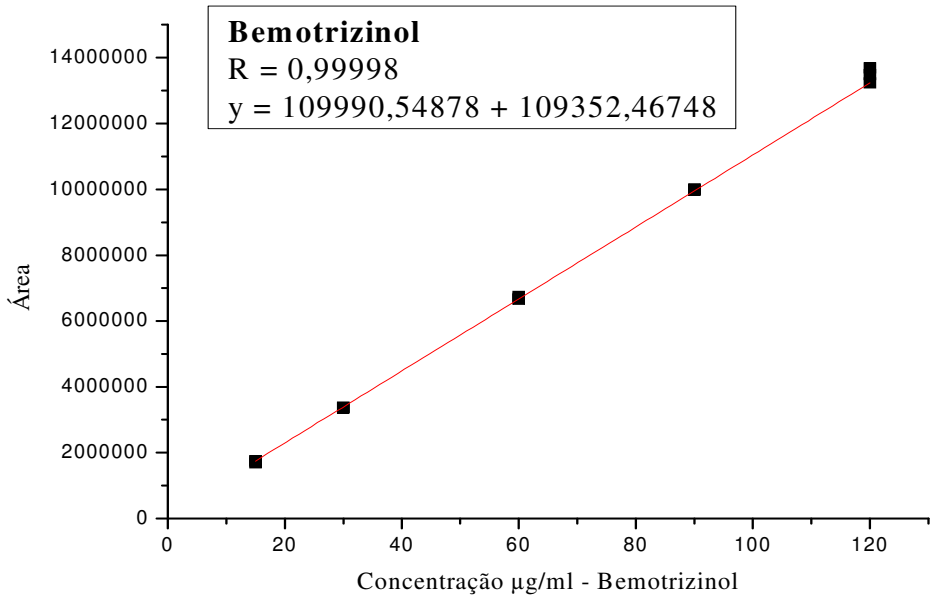


Figura 26: Curva analítica do bemotrizinol

5.2.1.4. Precisão e Exatidão

Os valores de precisão e exatidão/recuperação intra e inter-ensaio estão apresentados na Tabela 2 a seguir, nas quais se pode observar que o método por ser considerado preciso e exato (ANVISA, 2003; CASS; DEGANI, 2001)

Tabela 2: Precisão e exatidão intra-ensaio e inter-ensaio. BZF-3: benzofenona-3; OCT: octocrileno; MTX: metoxicinamato de etil-hexila; AVO: avobenzona; RET: retinol; DEEN: dietilexilnaftalato; PR: palmitato de retinila; BMTZ: bemotrizinol.

		Intra-ensaio (n=5)			Inter-ensaio (n=3)		
Substância	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração obtida ± DP (µg/ml)	Precisão	Exatidão (%)	Concentração obtida ± DP (µg/ml)	Precisão	Exatidão (%)
BZF-3	64	63,29± 2,92	4,61	98,89	64,06 ± 1,60	2,49	100,10
OCT	80	77,57 ± 3,74	4,82	96,96	78,85 ± 1,88	2,39	98,56
MTX	112	109,22 ± 4,31	3,95	97,52	110,56 ± 2,36	2,13	98,72
AVO	32	30,67 ± 1,57	5,13	95,86	31,40 ± 1,02	3,26	98,12
RET	64	62,52 ± 4,26	6,81	97,68	62,20 ± 3,74	6,01	97,18
DEEN	80	78,63 ± 1,61	2,05	98,29	77,64 ± 1,74	2,25	97,05
PR	95,2	80,54 ± 4,53	5,62	84,60	87,49 ± 6,51	7,44	91,91
BMTZ	48	46,34 ± 1,09	2,35	96,53	47,50 ± 1,94	4,09	98,95

5.2.1.5. Determinação da fotoestabilidade das formulações objeto de estudo

As concentrações remanescentes de cada filtro e vitamina (palmitato de retinila ou retinol) presentes nas formulações em estudo após a irradiação por UVA/UVB estão apresentadas nas Tabelas 3 a 8. As Figuras 27 a 34 representam os cromatogramas das formulações que continham metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno e avobenzona, associadas ao palmitato de retinila e ao retinol, F5Pr a F8Pr e F5Ret a F8Ret, respectivamente, submetidas ou não à irradiação. As Figuras 35 e 36 representam os gráficos com resultados da porcentagem remanescente dos filtros e vitaminas em estudo.

Tabela 3: Concentração remanescente da benzofenona-3

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1Pr	64	64,61	62,42	103,51	102,11
		64,12	63,67	100,70	
		61,57	62,81	98,04	
F2Pr		61,68	63,12	97,72	100,93
		65,21	62,62	104,13	
		57,78	56,33	102,58	
F3Pr		64,85	65,59	98,88	101,20
		65,73	63,50	103,51	
		61,84	58,82	105,13	
F4Pr		63,70	62,65	101,67	100,22
		64,49	65,29	98,78	
		61,39	62,19	98,71	
F1Ret		63,60	62,60	101,60	101,45
		63,08	62,27	101,31	
		62,57	60,05	104,20	
F2Ret		65,33	64,52	101,26	100,82
		63,96	63,71	100,39	
		58,79	58,31	100,81	
F3Ret		62,98	64,27	97,99	97,71
		65,10	66,82	97,43	
		59,10	59,00	100,16	
F4Ret		61,36	62,34	98,43	100,13
		61,82	60,71	101,84	
		60,86	59,86	101,67	

Tabela 4: Concentração remanescente do octocrileno

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1PR	80	79,43	76,56	103,75	102,17
		78,75	78,28	100,60	
		77,54	79,44	97,62	
F2PR		75,86	77,71	97,62	100,78
		80,51	77,46	103,94	
		72,74	70,17	103,67	
F3PR		79,23	80,47	98,46	100,96
		80,67	77,97	103,46	
		85,46	81,21	105,24	
F4PR		79,07	77,74	101,71	100,33
		80,10	80,96	98,95	
		76,92	78,56	97,91	
F5PR		80,94	77,68	104,19	103,43
		79,88	77,80	102,67	
		80,87	81,16	99,65	
F6PR		78,01	78,99	98,76	100,64
		78,46	76,53	102,52	
		74,70	75,58	98,83	
F7PR		76,68	79,14	96,90	97,34
		77,63	79,39	97,79	
		71,54	75,19	95,14	
F8PR		77,72	78,60	98,88	100,49
		79,89	78,24	102,11	
		73,98	72,97	101,38	

continua

conclusão

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1RET	80	79,01	77,40	102,08	102,13
		78,26	76,59	102,18	
		79,40	75,93	104,57	
F2RET		80,73	79,78	101,20	100,70
		78,98	78,81	100,20	
		74,24	73,14	101,50	
F3RET		77,45	78,84	98,23	97,51
		79,57	82,21	96,79	
		82,25	81,51	100,91	
F4RET		76,43	77,38	98,77	100,29
		76,82	75,45	101,81	
		77,49	75,89	102,10	
F5RET		76,05	76,30	99,67	100,02
		78,40	78,11	100,37	
		82,18	76,47	107,46	
F6RET		77,34	76,50	101,10	100,57
		74,50	74,47	100,05	
		74,94	77,10	97,20	
F7RET		80,57	75,32	106,97	104,48
		77,95	76,43	101,98	
		77,95	78,85	98,86	
F8RET		73,88	79,02	93,49	95,30
		77,64	79,95	97,11	
		74,21	77,32	95,98	

Tabela 5: Concentração remanescente do metoxicinamato de etil-hexila

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1PR	112	104,27	108,41	96,18	95,25
		104,22	110,48	94,33	
		94,83	111,12	85,34	
F2PR		98,06	107,61	91,13	93,69
		103,23	107,26	96,25	
		90,53	99,29	91,17	
F3PR		103,60	111,75	92,70	94,09
		103,80	108,70	95,49	
		98,31	104,44	94,14	
F4PR		103,64	107,55	96,36	95,73
		106,19	111,66	95,11	
		101,76	110,12	92,41	
F5PR		101,58	107,84	94,19	94,53
		102,58	108,13	94,86	
		101,88	113,70	89,61	
F6PR		97,75	110,10	88,79	91,65
		100,86	106,71	94,52	
		90,28	106,08	85,11	
F7PR		97,03	109,29	88,79	89,73
		99,60	109,85	90,67	
		90,68	104,80	86,53	
F8PR		100,82	109,46	92,11	93,75
		104,05	109,08	95,39	
		96,90	103,41	93,71	

continua

conclusão

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1RET	112	101,82	109,37	93,10	93,11
		101,08	108,57	93,11	
		100,43	107,14	93,74	
F2RET		102,78	109,89	93,53	93,25
		101,07	108,72	92,97	
		92,49	103,45	89,40	
F3RET		101,74	109,42	92,98	91,93
		102,96	113,29	90,88	
		96,53	105,43	91,56	
F4RET		100,53	106,90	94,03	94,41
		99,70	104,40	95,50	
		100,52	107,29	93,69	
F5RET		95,74	105,59	90,67	91,29
		99,37	108,11	91,91	
		102,16	107,35	95,16	
F6RET		99,16	107,85	91,95	90,44
		96,46	104,96	88,92	
		91,52	108,47	84,37	
F7RET		102,68	105,38	97,43	96,56
		102,28	106,89	95,69	
		98,37	109,53	89,81	
F8RET		98,55	110,12	89,50	90,18
		100,70	110,83	90,86	
		96,94	109,32	88,68	

Tabela 6: Concentração remanescente de avobenzona

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F5PR	32	27,05	29,58	91,46	92,52
		27,53	29,42	93,58	
		58,14	61,15	95,08	
F6PR		26,14	29,99	87,15	90,66
		26,85	28,51	94,16	
		56,44	58,38	96,68	
F7PR		25,62	29,85	85,85	86,93
		26,61	30,23	88,01	
		59,19	59,29	99,83	
F8PR		27,04	29,45	91,80	93,82
		28,18	29,40	95,83	
		53,40	56,94	93,81	
F5RET		27,59	31,31	88,11	
		28,56	31,86	89,64	92,37
		55,67	58,54	95,09	
F6RET		28,47	31,83	89,47	89,32
		26,99	30,27	89,18	
		47,95	60,71	78,99	
F7RET		31,06	31,43	98,83	96,60
		28,95	30,67	94,37	
		53,73	60,81	88,36	
F8RET		29,60	32,19	91,96	86,24
		25,87	32,13	80,51	
		52,41	52,31	100,20	

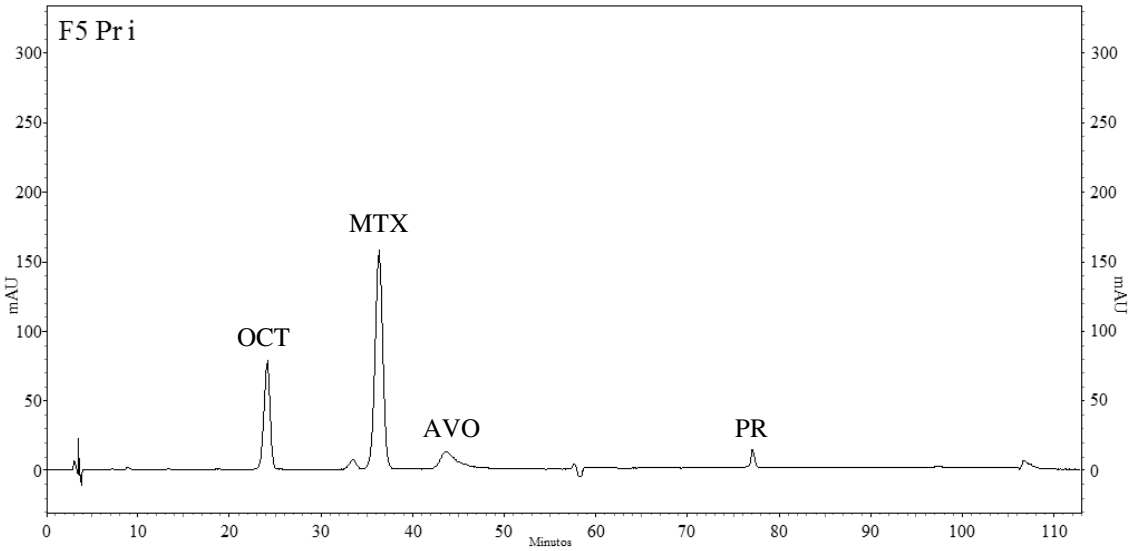
Tabela 7: Concentração remanescente de retinol

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1RET	64	28,51	59,24	48,13	49,80
		29,62	57,55	51,47	
		37,13	57,94	64,09	
F2RET		30,92	58,96	52,43	50,14
		30,13	62,98	47,84	
		33,24	66,20	50,21	
F3RET		28,34	62,85	45,09	47,255
		28,79	60,87	47,30	
		33,23	67,29	49,37	
F4RET		36,05	56,13	64,23	71,74
		34,21	43,17	79,25	
		43,39	59,65	72,74	
F5RET		25,45	56,38	45,14	47,75
		30,01	59,60	50,36	
		29,62	58,99	50,20	
F6RET		28,80	64,94	44,35	46,21
		29,73	61,85	48,07	
		27,86	62,39	44,66	
F7RET		28,10	55,56	50,58	52,30
		31,43	58,18	54,02	
		28,07	58,87	47,67	
F8RET		38,15	61,38	62,15	57,82
		32,96	61,62	53,49	
		33,68	60,50	55,66	

Tabela 8: Concentração remanescente de palmitato de retinila

Formulação	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração na lâmina irradiada (µg/ml)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/ml)	Concentração remanescente após a irradiação (%)	Média da Concentração remanescente (%)
F1PR	95,2	25,20	68,73	36,66	22,35
		17,07	86,45	19,75	
		8,37	78,59	10,65	
F2PR		20,06	81,56	24,59	24,68
		28,91	100,51	28,76	
		19,03	92,04	20,68	
F3PR		17,42	75,88	22,96	23,63
		21,69	85,08	25,49	
		18,51	82,48	22,44	
F4PR		45,16	85,04	53,11	54,42
		46,63	101,93	45,75	
		58,91	91,48	64,39	
F5PR		31,40	90,03	34,88	32,32
		35,67	88,50	40,31	
		19,23	88,26	21,79	
F6PR		29,48	77,47	38,05	33,82
		31,47	76,40	41,19	
		17,09	76,93	22,22	
F7PR		21,37	88,91	24,04	26,07
		31,64	93,94	33,68	
		18,74	91,42	20,50	
F8PR		34,95	86,68	40,32	38,10
		36,67	93,79	39,09	
		31,49	90,24	34,89	

(A)



(B)

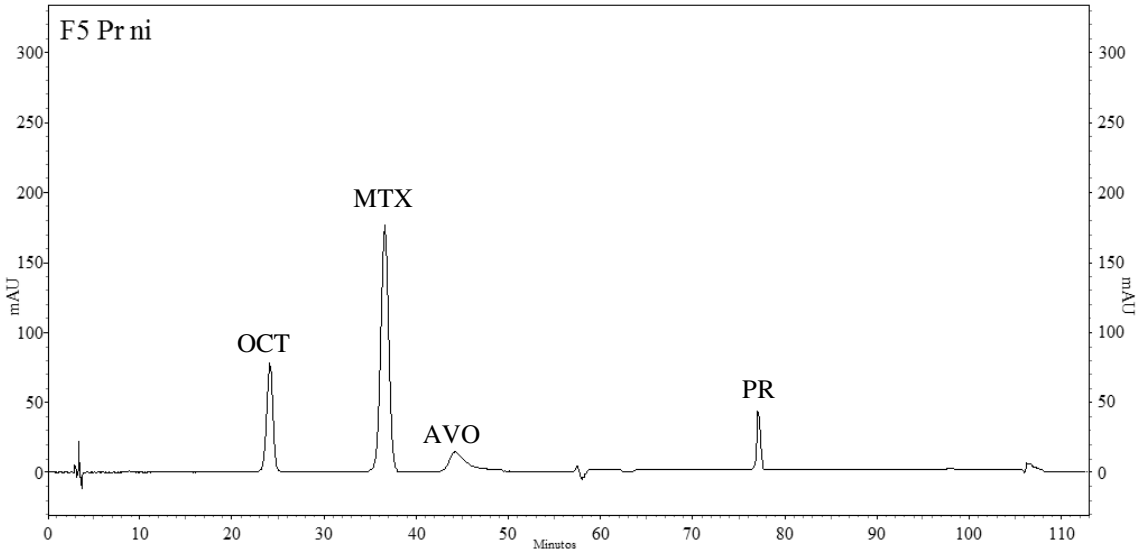
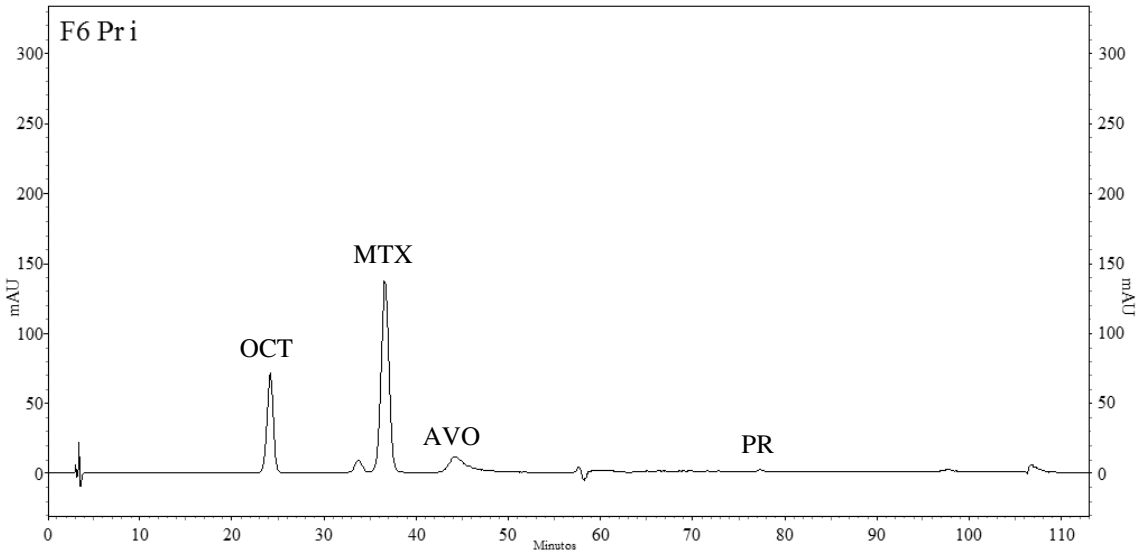


Figura 27: Cromatogramas da formulação F5Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

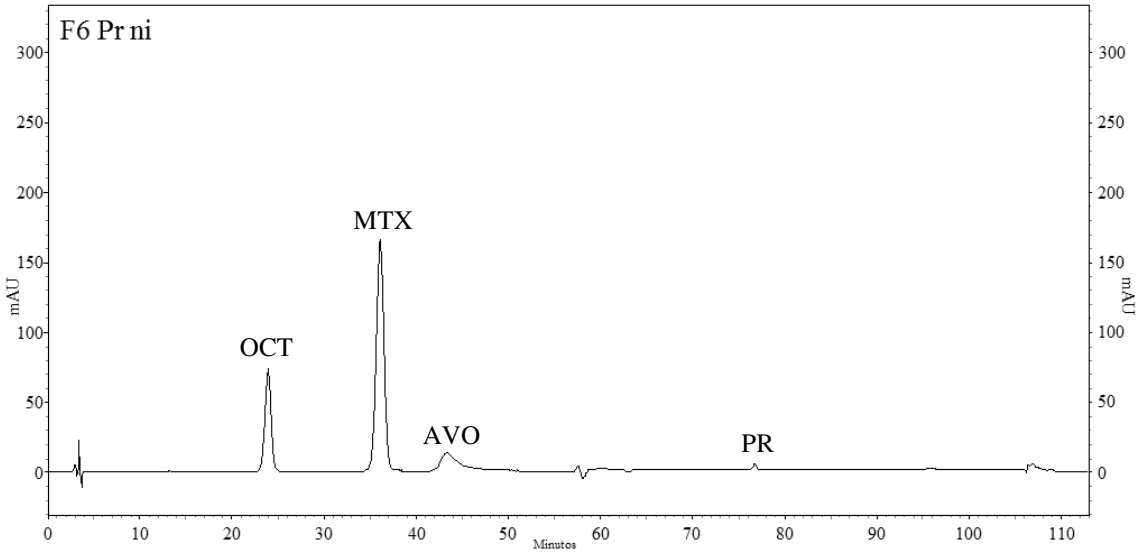
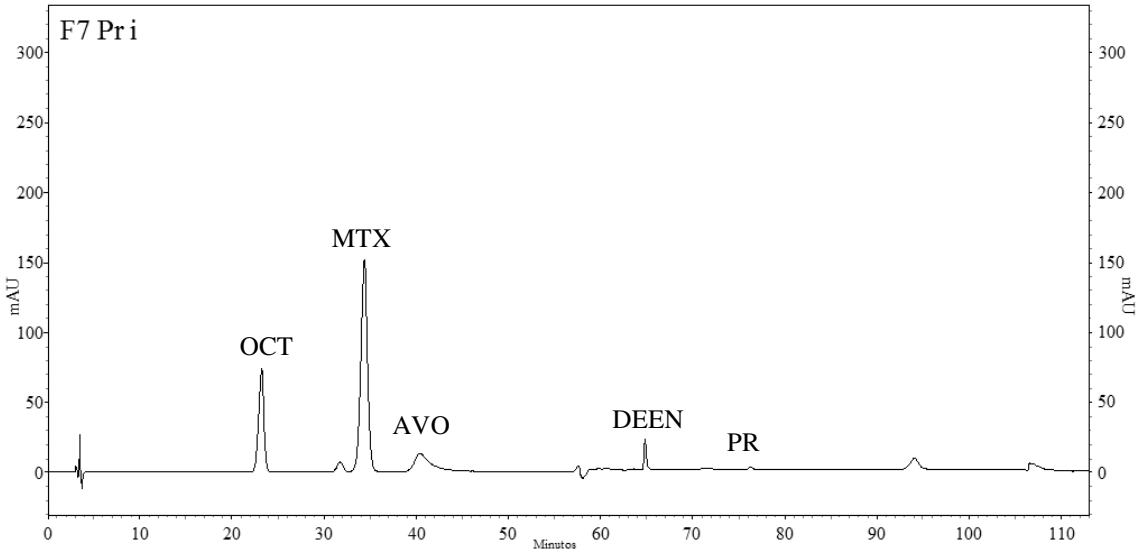


Figura 28: Cromatogramas da formulação F6Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, benzotriazolil dodecil p-cresol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

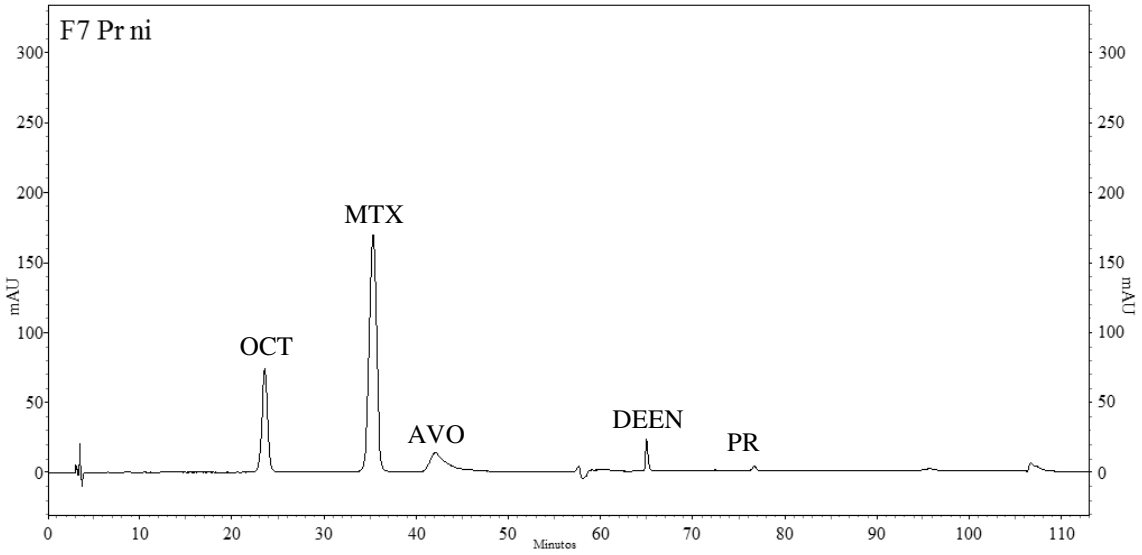
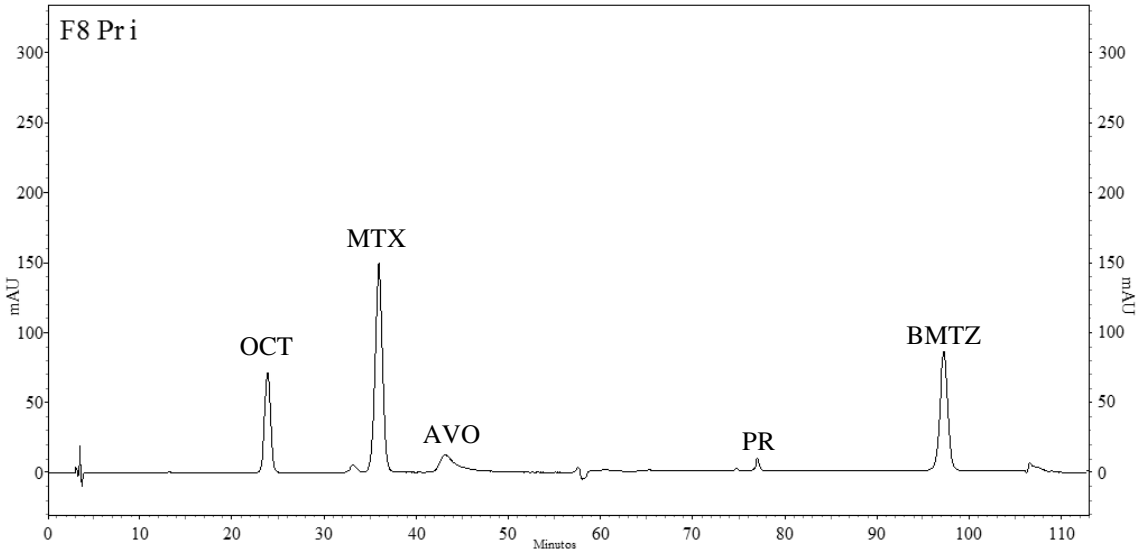


Figura 29: Cromatogramas da formulação F7Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, dietilexilnaftalato e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

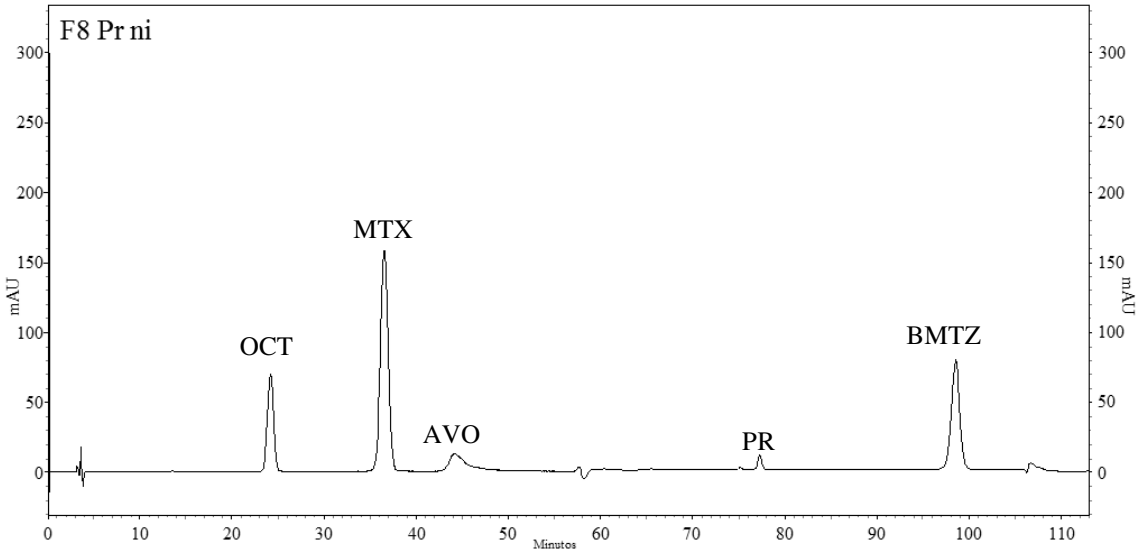
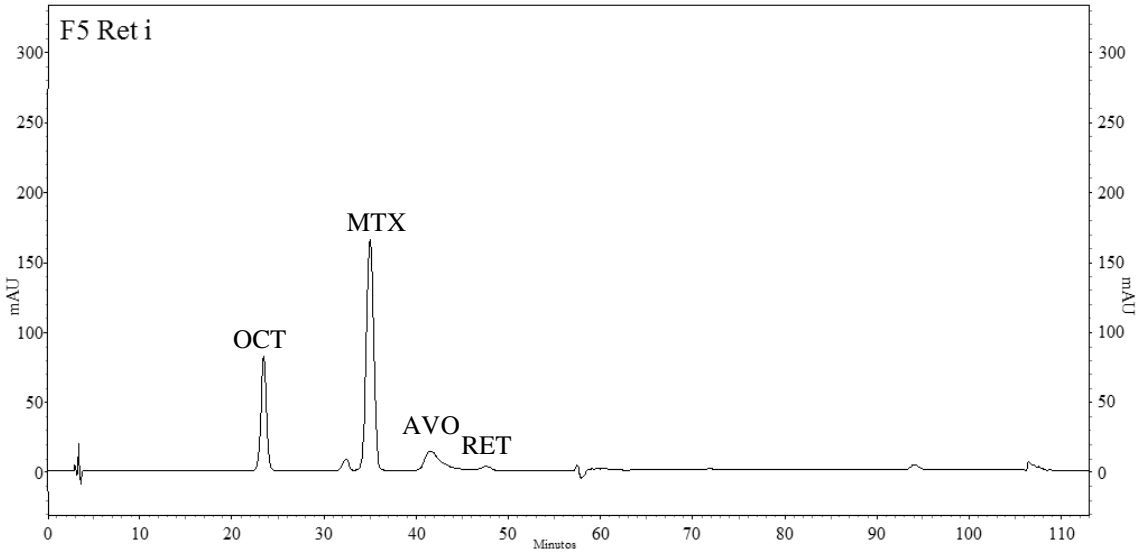


Figura 30: Cromatogramas da formulação F8Pr que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, bemotrizinol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

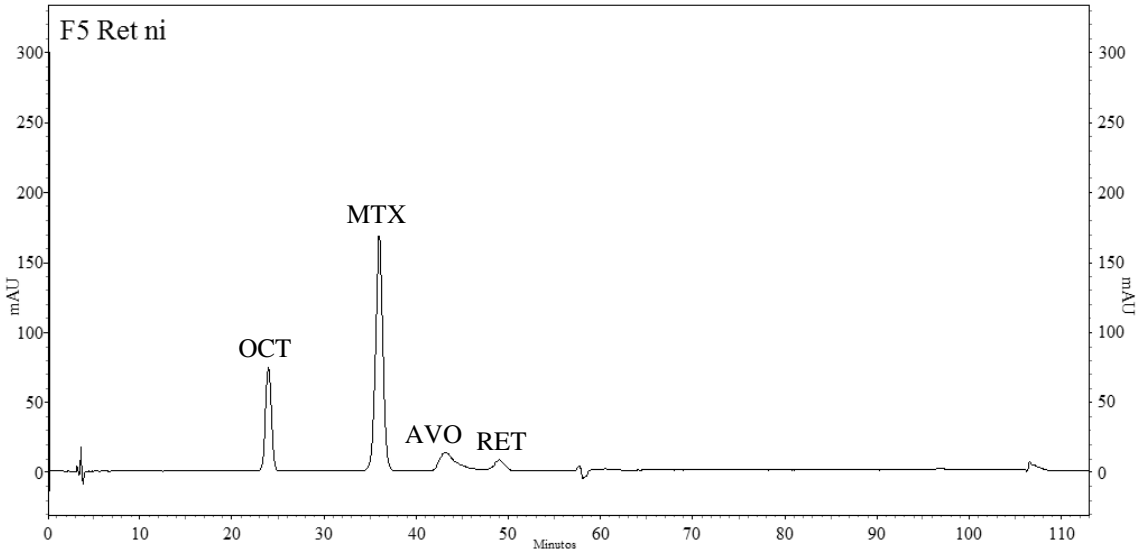
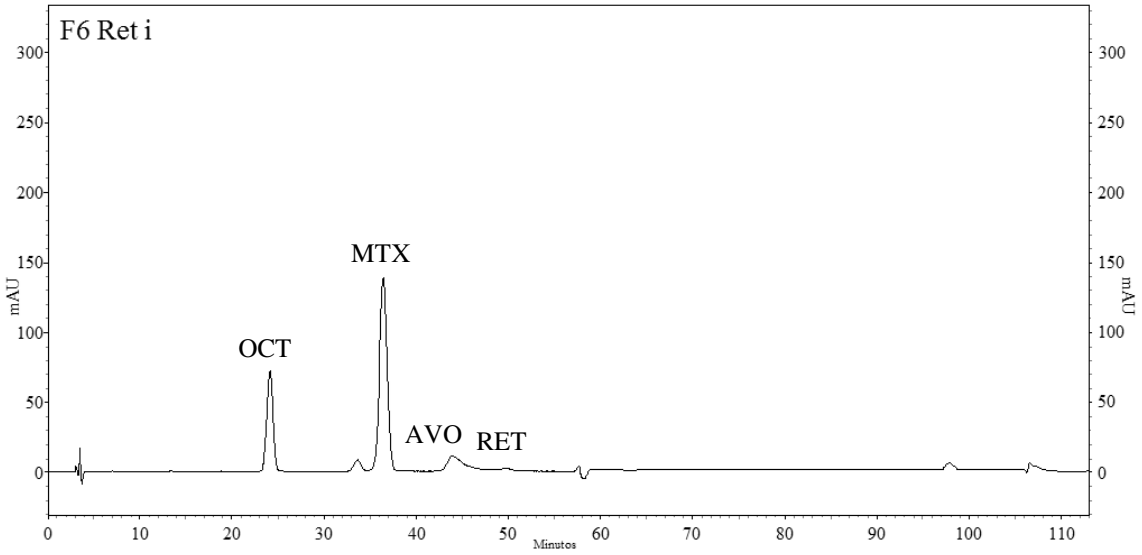


Figura 31: Cromatogramas da formulação F5Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

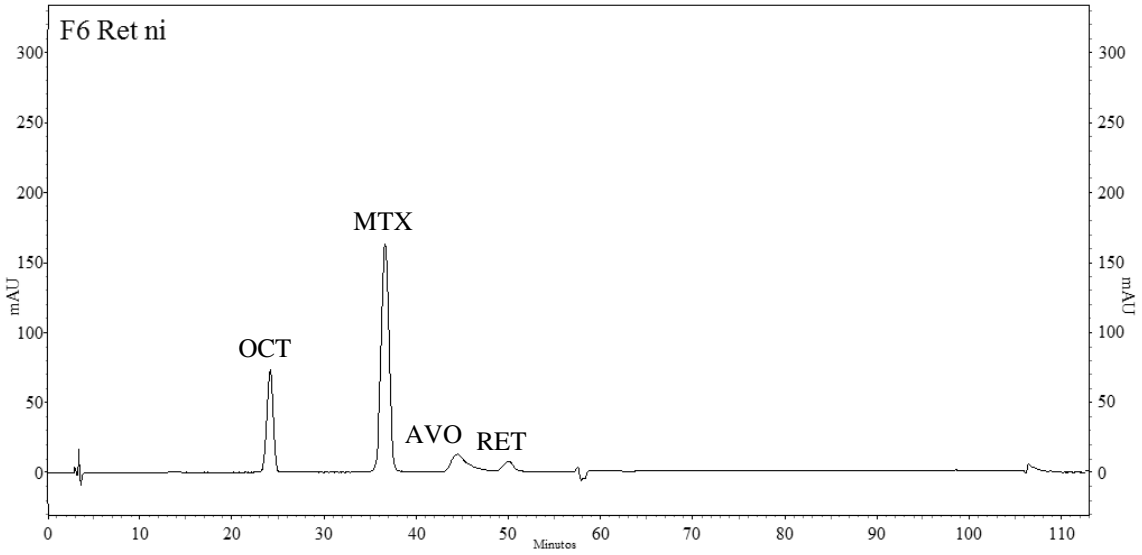
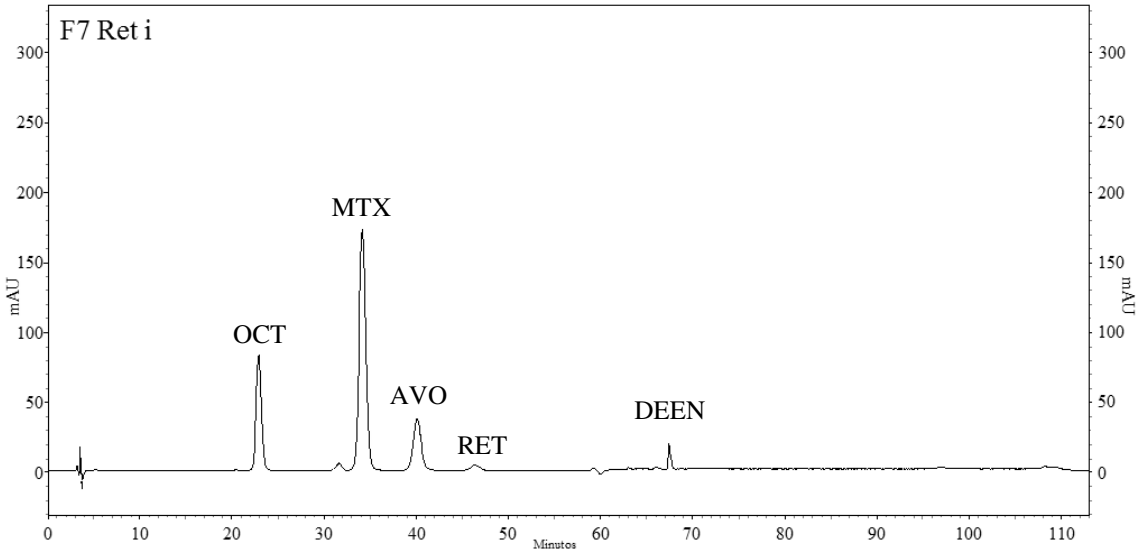


Figura 32: Cromatogramas da formulação F6Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, benzotriazolil dodecil p-cresol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

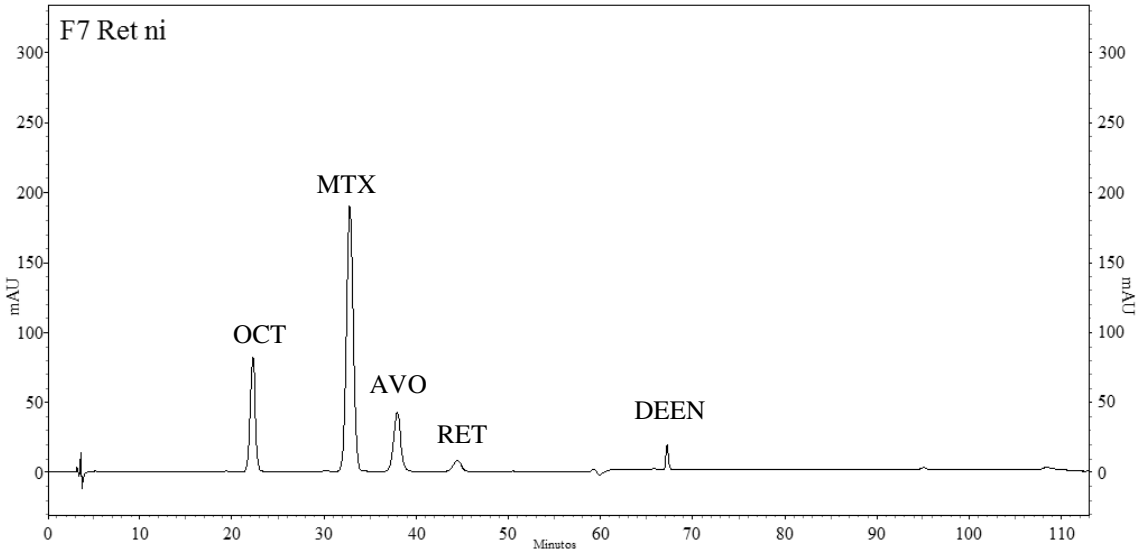
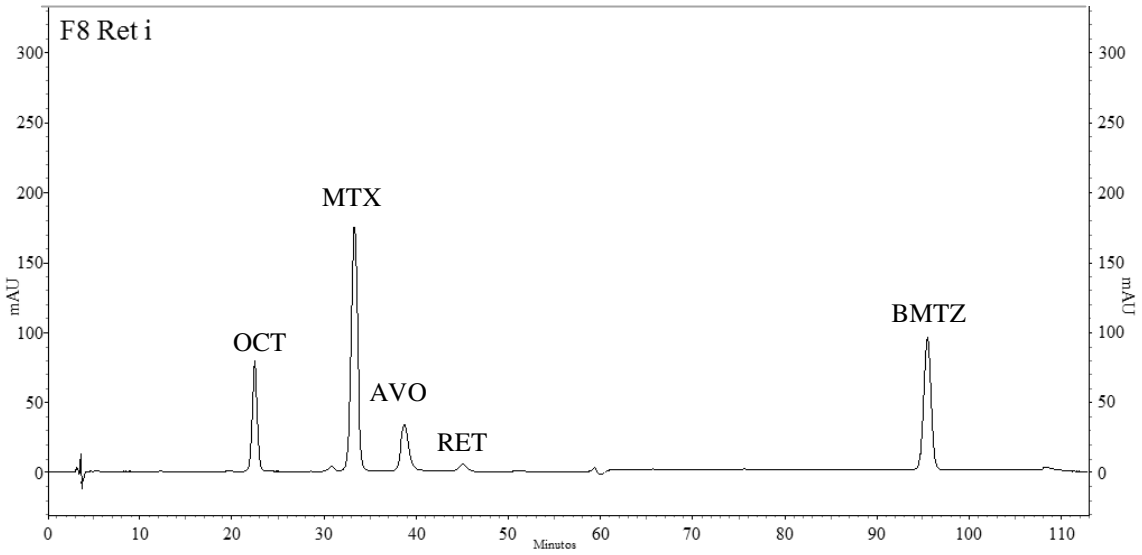


Figura 33: Cromatogramas da formulação F7Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, dietilexilnaftalato e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

(A)



(B)

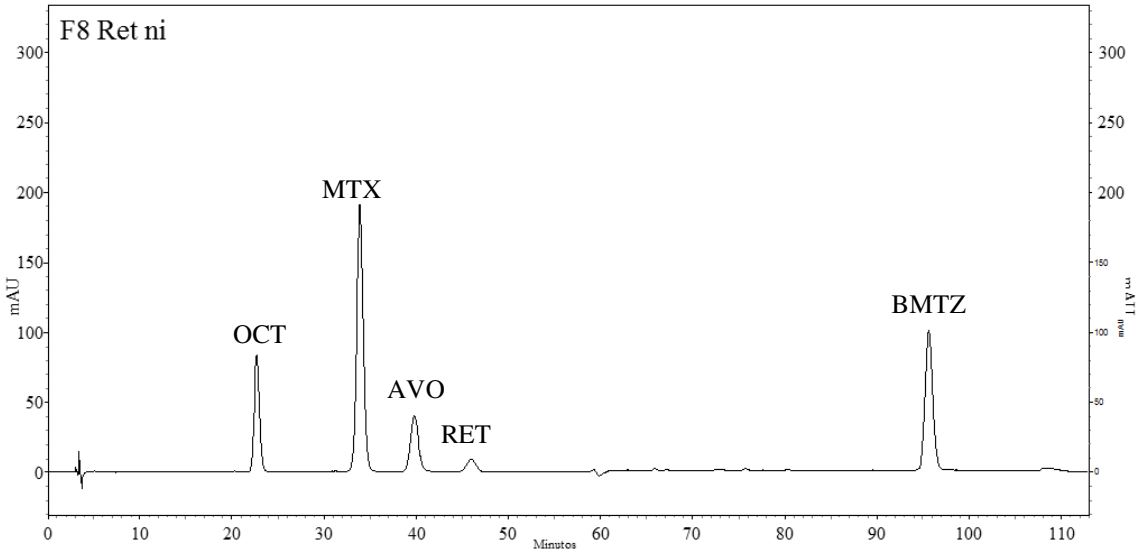


Figura 34: Cromatogramas da formulação F8Ret que continha metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, avobenzona, bemotrizinol e palmitato de retinila, quando submetida (**A**) ou não à irradiação (**B**).

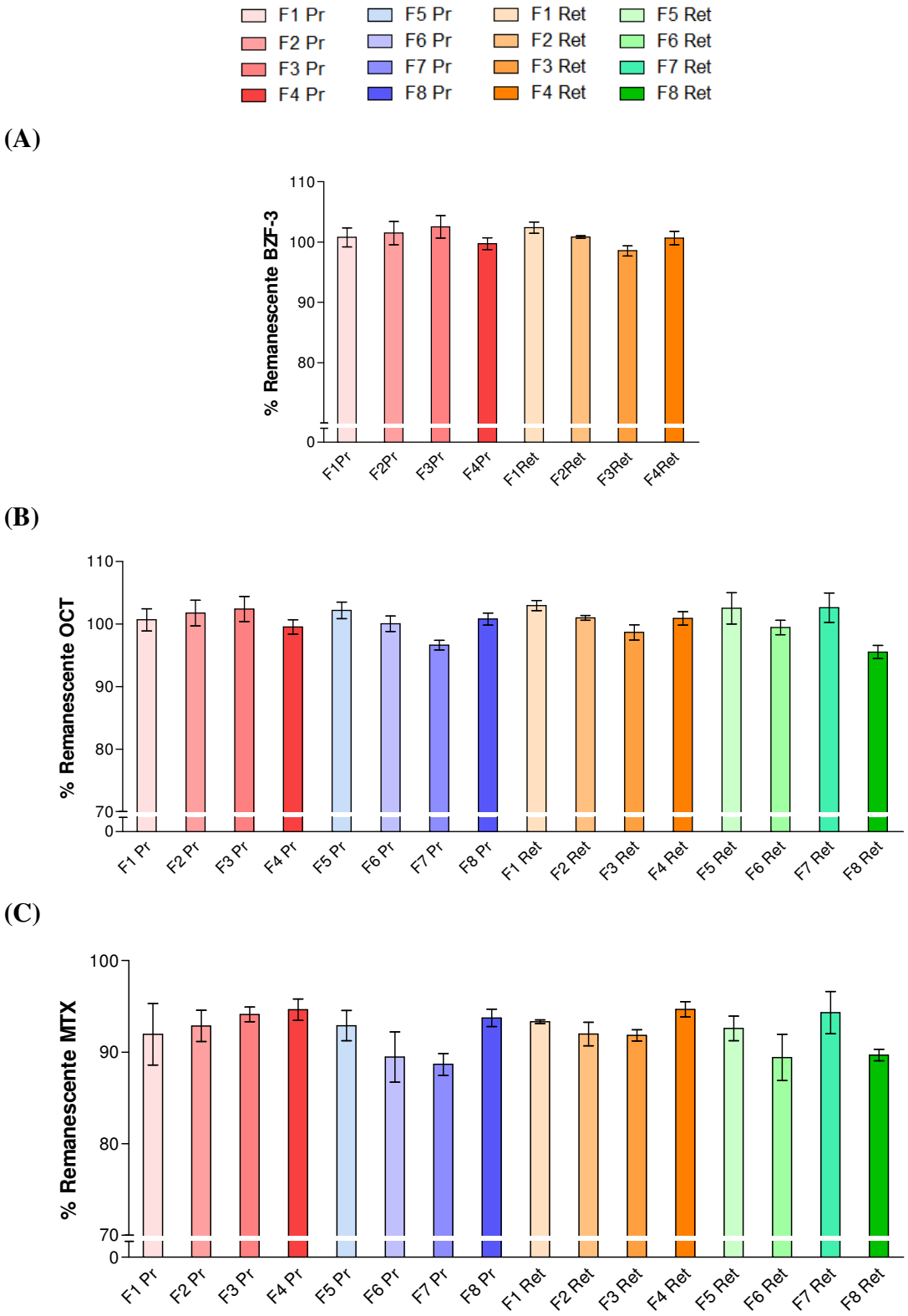


Figura 35 – Concentração remanescente dos filtros solares analisados presentes nas formulações em estudo quando submetidas radiação UVA/UVB. **A:** benzofenona-3; **B:** octocrileno; **C:** metoxicinamato de etil-hexila.

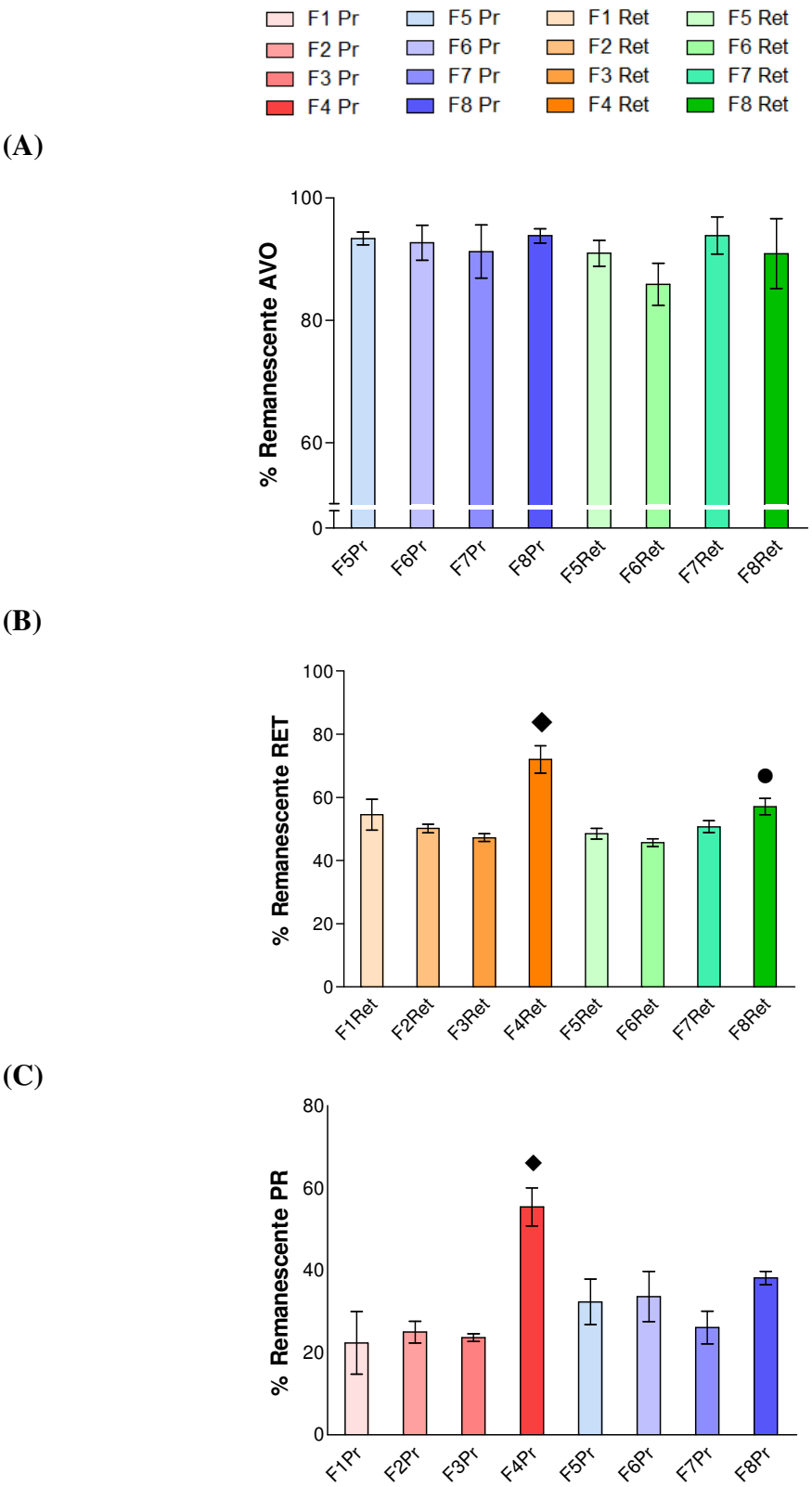


Figura 36 – Concentração remanescente dos filtros solares e vitaminas analisados presentes nas formulações em estudo quando submetidas à radiação UVA/UVB. **A:** AVO: avobenzona; **B:** RET: retinol; **C:** PR: palmitato de Retinila.
◆= estatisticamente maior que F1Pr ou F1Ret, ●= estatisticamente maior que F5Ret

Os resultados obtidos no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis indicaram que, quando as quantidades remanescentes de benzofenona-3, octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila e avobenzona foram analisadas, observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as formulações em estudo após 15 minutos de irradiação (Figuras 35A, 35B, 35C e 36A, respectivamente).

Quando a concentração remanescente das vitaminas em estudo foi analisada, o estabilizador bemotrizinol foi considerado o melhor estabilizador tanto para o palmitato de retinila (F4Pr) ($p<0,05$), quanto para o retinol (F4Ret e F8Ret) ($p<0,05$), uma vez que esse estabilizador protegeu as vitaminas de degradação frente ao UV (Figuras 36B e 36C).

Os estabilizadores de filtros solares benzotriazolil dodecil p-cresol e dietilexilnaftalato apresentaram um efeito maior na proteção da associação palmitato de retinila/avobenzona (F6Pr e F7Pr) quando comparada com a associação palmitato de retinila/benzofenona-3 (F2Pr e F3Pr), entretanto essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa (Figura 36C).

5.2.2 Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

Os resultados obtidos para as formulações, quando submetidas ou não à irradiação, estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 37.

Tabela 9 - Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA, UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação.

Formulação	$\int_{320}^{400}$ UVA		$\int_{280}^{320}$ UVB		RAZÃO UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB
	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	
F1Pr	35,22	27,69	101,84	65,68	0,346	0,422	-0,22
	35,27	30,55	92,73	69,54	0,380	0,439	-0,16
	23,87	26,21	57,64	62,63	0,414	0,418	-0,01
	24,19	20,60	57,96	52,66	0,417	0,391	0,06
F2Pr	31,79	26,57	70,15	62,70	0,453	0,424	0,06
	27,14	27,15	66,19	64,21	0,410	0,423	-0,03
	32,52	22,39	53,11	59,03	0,612	0,379	0,38
	31,39	18,41	56,80	55,78	0,553	0,330	0,40
F3Pr	29,41	29,19	73,85	67,85	0,398	0,430	-0,08
	33,94	38,40	81,83	79,35	0,415	0,484	-0,17
	32,74	28,55	64,44	70,68	0,508	0,404	0,20
	33,94	36,02	81,83	69,56	0,415	0,518	-0,25
F4Pr	51,77	48,40	83,29	74,45	0,622	0,650	-0,05
	53,74	55,71	89,97	86,09	0,597	0,647	-0,08
	50,23	33,93	67,11	65,57	0,748	0,518	0,31
	55,17	56,63	71,29	91,39	0,774	0,620	0,20
F5Pr	33,72	22,70	48,40	37,58	0,697	0,604	0,13
	34,44	24,62	48,04	40,48	0,717	0,608	0,15
	38,75	29,29	48,22	45,03	0,804	0,650	0,19
	38,12	28,69	47,36	44,91	0,805	0,639	0,21
F6Pr	29,15	23,77	43,57	38,69	0,669	0,614	0,08
	30,59	23,52	43,27	41,90	0,707	0,561	0,21
	36,58	26,23	45,65	42,47	0,801	0,618	0,23
	36,13	22,87	45,01	38,25	0,803	0,598	0,26

continua

continuação

Formulação	$\int_{320}^{400}$ UVA		$\int_{280}^{320}$ UVB		RAZÃO UVA/UVB		
	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	Queda na razão UVA/UVB
F7Pr	30,64	24,09	46,72	41,44	0,656	0,581	0,11
	30,67	26,35	46,59	44,98	0,658	0,586	0,11
	38,65	27,805	49,89	43,495	0,775	0,639	0,17
	40,46	26,78	52,08	48,74	0,777	0,550	0,29
F8Pr	42,75	41,87	49,78	47,83	0,859	0,875	-0,02
	47,97	30,67	54,68	35,31	0,877	0,869	0,01
	52,99	36,25	74,89	52,84	0,708	0,686	0,03
	48,74	37,90	68,66	55,67	0,710	0,681	0,04
F1Ret	24,10	22,43	59,96	55,61	0,402	0,403	0,00
	24,81	20,58	61,87	54,07	0,401	0,381	0,05
	22,22	23,02	55,6825	56,20	0,399	0,410	-0,03
	22,22	23,02	52,41	56,85	0,424	0,405	0,04
F2Ret	23,31	22,81	56,98	54,84	0,409	0,416	-0,02
	24,39	24,68	59,89	55,53	0,407	0,444	-0,09
	23,65	20,31	56,66	50,93	0,417	0,399	0,04
	22,22	23,47	53,41	57,82	0,416	0,406	0,02
F3Ret	25,24	25,24	63,88	67,30	0,395	0,375	0,05
	26,16	27,21	67,11	70,06	0,390	0,388	0,00
	24,81	22,36	63,88	59,10	0,388	0,378	0,03
	24,19	22,22	62,41	60,61	0,388	0,367	0,05
F4Ret	46,65	44,01	76,75	72,12	0,608	0,610	0,00
	44,91	44,91	72,98	72,15	0,615	0,622	-0,01
	43,10	40,29	74,65	68,79	0,577	0,586	-0,01
	42,21	39,79	75,01	75,09	0,563	0,530	0,06

continua

continuação

Formulação	$\int_{320}^{400}$ UVA		$\int_{280}^{320}$ UVB		RAZÃO UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB
	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	
F5Ret	32,69	34,42	47,63	50,77	0,686	0,678	0,01
	34,97	35,45	51,38	51,75	0,681	0,685	-0,01
	36,81	27,65	43,41	45,40	0,848	0,609	0,28
	32,73	28,09	45,51	47,89	0,719	0,587	0,18
F6Ret	34,65	28,90	50,47	44,67	0,687	0,647	0,06
	36,15	36,67	51,96	52,04	0,696	0,705	-0,01
	32,23	37,90	51,86	51,67	0,621	0,734	-0,18
	31,25	38,17	47,14	52,04	0,663	0,733	-0,11
F7Ret	33,98	33,03	45,50	52,26	0,747	0,632	0,15
	38,52	33,58	42,68	54,12	0,902	0,620	0,31
	48,04	30,93	67,61	47,47	0,711	0,652	0,08
	34,42	30,86	50,31	47,47	0,684	0,650	0,05
F8Ret	42,18	36,00	58,55	53,52	0,720	0,673	0,07
	42,69	38,04	59,53	53,57	0,717	0,710	0,01
	42,62	38,54	59,02	52,98	0,722	0,728	-0,01
	43,01	38,89	58,98	53,33	0,729	0,729	0,00
F1	19,97	21,79	53,31	58,11	0,375	0,375	0,00
	20,87	21,24	55,81	55,41	0,374	0,383	-0,03
	20,44	21,24	54,56	56,77	0,375	0,374	0,00
	21,44	20,55	53,98	57,65	0,397	0,356	0,10
F2	22,71	22,13	59,31	57,78	0,383	0,383	0,00
	22,85	22,54	58,59	57,94	0,390	0,389	0,00
	22,81	22,36	58,96	57,87	0,387	0,386	0,00
	22,86	22,44	58,26	57,56	0,392	0,390	0,01

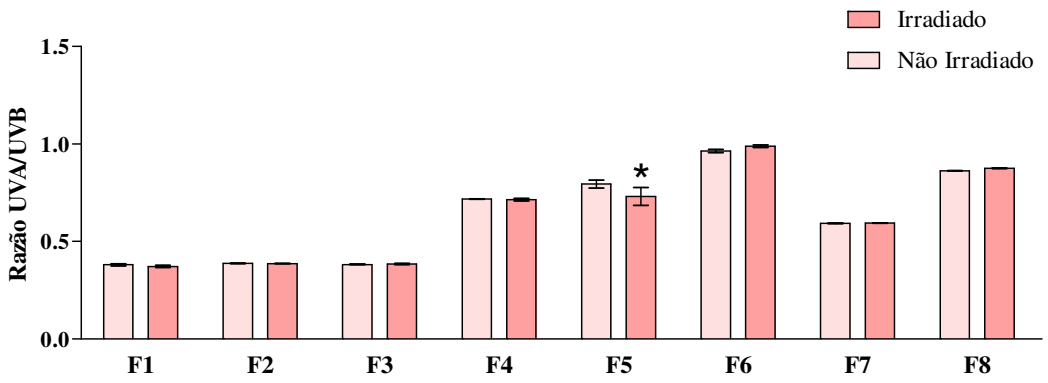
continua

conclusão

Formulação	$\int_{320}^{400}$ UVA		$\int_{280}^{320}$ UVB		RAZÃO UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB
	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	
F3	23,12	11,86	59,94	31,81	0,386	0,373	0,03
	23,08	21,61	60,43	55,44	0,382	0,390	-0,02
	23,12	16,75	60,19	43,64	0,384	0,384	0,00
	22,47	17,01	59,65	43,58	0,377	0,390	-0,04
F4	51,06	32,02	71,33	44,05	0,716	0,727	-0,02
	51,23	49,12	70,96	68,54	0,722	0,717	0,01
	51,16	40,60	71,15	56,30	0,719	0,721	0,00
	51,23	40,23	71,55	57,85	0,716	0,695	0,03
F5	30,44	32,06	38,01	38,85	0,801	0,825	-0,03
	33,67	32,69	44,69	49,61	0,753	0,659	0,13
	32,07	31,97	41,36	49,30	0,775	0,648	0,16
	33,60	32,14	39,65	40,42	0,847	0,795	0,06
F6	40,18	34,44	40,72	35,10	0,987	0,981	0,01
	40,55	33,77	42,63	33,56	0,951	1,006	-0,06
	40,38	34,11	41,69	34,34	0,969	0,993	-0,03
	40,42	33,05	42,55	33,89	0,950	0,975	-0,03
F7	31,88	29,87	53,29	50,41	0,598	0,593	0,01
	29,71	30,56	50,47	51,05	0,589	0,599	-0,02
	30,80	30,24	51,89	50,74	0,594	0.596	-0,23
	30,11	30,25	50,88	51,25	0,592	0,590	0,00
F8	53,82	63,79	62,21	73,10	0,865	0,873	-0,01
	55,78	60,11	64,62	68,39	0,863	0,879	-0,02
	54,82	61,96	63,43	70,76	0,864	0,876	-0,01
	54,89	60,86	63,92	69,56	0,859	0,875	-0,02

Quando os valores da razão UVA/UVB foram analisados, podemos observar que as formulações fotoprotetoras contendo ou não os diferentes estabilizadores de filtros solares em estudo, não apresentaram queda significativa na razão UVA/UVB após a irradiação (Figura 37). Exceto a formulação contendo apenas avobenzona (F5), que quando irradiada apresentou valores estatisticamente menores que seu controle não irradiado ($p<0,01$). No entanto, pode-se observar que os três estabilizadores de filtros solares em estudo aumentaram a fotoestabilidade dessa associação (F6 à F8) (Figura 37).

As formulações contendo benzofenona-3 não apresentaram redução da fotoestabilidade mesmos sem a presença de estabilizadores de filtros solares, uma vez que a formulação contendo apenas benzofenona-3 (F1), quando irradiada apresentou valores da razão UVA/UVB estatisticamente iguais à formulação controle não irradiada (Figura 37).



* = valores estatisticamente diferentes do respectivo controle não irradiado ($p<0,01$)

Figura 37. Razão da integral do espectro de absorção UVA/UVB das associações de filtros e estabilizadores, quando submetidas ou não à irradiação durante 15 minutos.

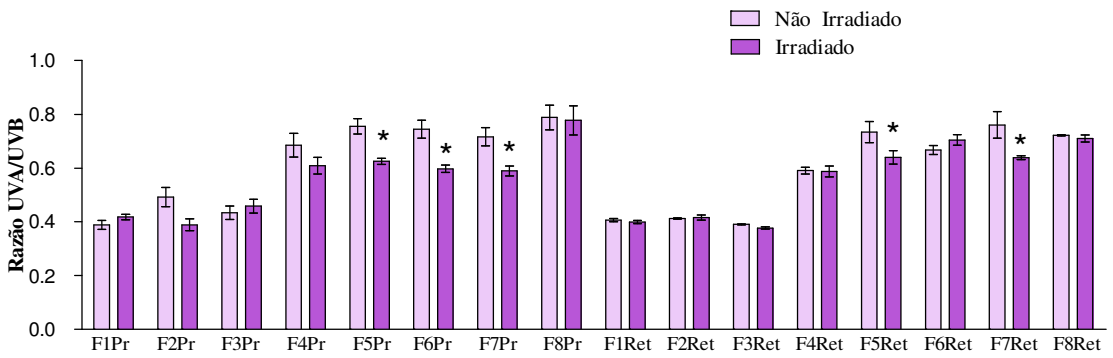
Em relação às formulações contendo avobenzona associada ao retinol ou palmitato de retinila, na ausência de estabilizadores de filtros solares, foi possível observar que ambas as formulações, F5Pr e F5Ret, foram consideradas fotoinstáveis, apresentando queda estatisticamente significativa da razão UVA/UVB ($p<0,01$) (Tabela 9 e Figura 38).

Quando analisamos as associações com os diferentes estabilizadores de filtros solares, foi possível observar que o benzotriazolil dodecil p-cresol não foi um bom estabilizador para as formulações contendo palmitato de retinila e avobenzona (F6Pr), apresentando redução significativa na proporção de proteção UVA em relação à UVB quando irradiada ($p<0,01$) (Figura 38).

Além disso, o dietilexilnaftalato não foi considerado um bom estabilizador para as formulações contendo avobenzona acrescida de palmitato de retinila ou retinol (F7Pr e F7Ret, respectivamente) (Figura 38).

Dessa forma, foi possível observar que não houve queda de absorção na faixa do UVA para as formulações que continham avobenzona F6Ret, F8Ret e F8PR (Figura 38), dessa forma, as formulações foram consideradas fotoestáveis.

As formulações que continham benzofenona-3 acrescidas de palmitato de retinila (Pr) ou retinol (Ret) não apresentaram redução na relação UVA/UVB, após irradiação, sendo, portanto, consideradas fotoestáveis (Figura 38).



* = valores estatisticamente diferentes do respectivo controle não irradiado ($p<0,01$)

Figura 38. Razão da integral do espectro de absorção UVA/UVB das associações de filtros e estabilizadores, contendo palmitato de retinila (PR) ou retinol (RET), quando submetidas ou não à irradiação durante 15 minutos.

5.3. Avaliação da fototoxicidade

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade à radiação estão apresentados na Tabela 10, onde se pode observar que as células apresentam viabilidade dentro dos critérios de aceitação determinados no estudo de validação, ou seja, uma viabilidade celular de pelo menos 80% quando as células foram submetidas a uma dose de 5 J/cm^2 (OECD, 2004).

Tabela 10. Sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA

Dose (J/cm^2)	Viabilidade celular (% em relação ao - UVA)
3	95,6
5	80,6
9	50,3
16	33,0

5.3.1. Análise das substâncias isoladas

Dentre as substâncias analisadas isoladamente, a avobenzona, o dietilexilnaftalato e o retinol apresentaram potencial fototóxico, pois obtiveram MPE maior que 0,15 (avobenzona: 0,340 e 1,015), (retinol: 0,385 e 0,161), (dietilexilnaftalato: 0,610 e 0,638), os quais estão acima dos limites aceitáveis para substâncias consideradas não fototóxicas.

Segundo os critérios de aceitação determinados no estudo de validação do método (OECD, 2004), os controles também apresentam valores aceitáveis: controle positivo norfloxacina MPE: 0,476 (OECD: 0,34-0,9), e o controle negativo L-histidina MPE: 0,064 (OECD: 0,05-0,01) (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N = 2)

Substância	MPE	EC 50 (-UV) µg/mL	EC 50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
Metoxicinamato de etil-hexila	-0,143 -0,065	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico
Octocrileno	0,011 -0,342	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico
Benzofenona – 3	0,100 0,081	81,891 43,039	82,854 35,363	0,994 1,222	Não fototóxico
Avobenzona	**0,340** [b] **0,422** [b]	ND ND	23,782 10,00	4,205 9,970	**Fototóxico**
Benzotriazolil dodecil p-cresol	-0,185 -0,058	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico
Dietilexilnaftalato	**0,610** [b] **0,638** [b]	ND ND	7,817 6,979	18,25 14,36	**Fototóxico**
Bemotrizinol	0,026 0,057	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico
Palmitato de Retinila	-0,014 0,008	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico
Retinol	**0,385** [b] **0,161** [b]	ND ND	27,349 32,215	3,658 3,105	**Fototóxico**
L-histidina (controle negativo)	-0,064	ND	ND	1,000	Não fototóxico
Norfloxacina (controle positivo)	**0,476** [b]	76.940	39.827	272,381	**Fototóxico**

Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. [a]: Provavelmente fototóxico. [b]: Fototóxico.

A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das substâncias (Figuras 39 a 41) em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas, as quais foram geradas pelo Software Phototox versão 2.0.

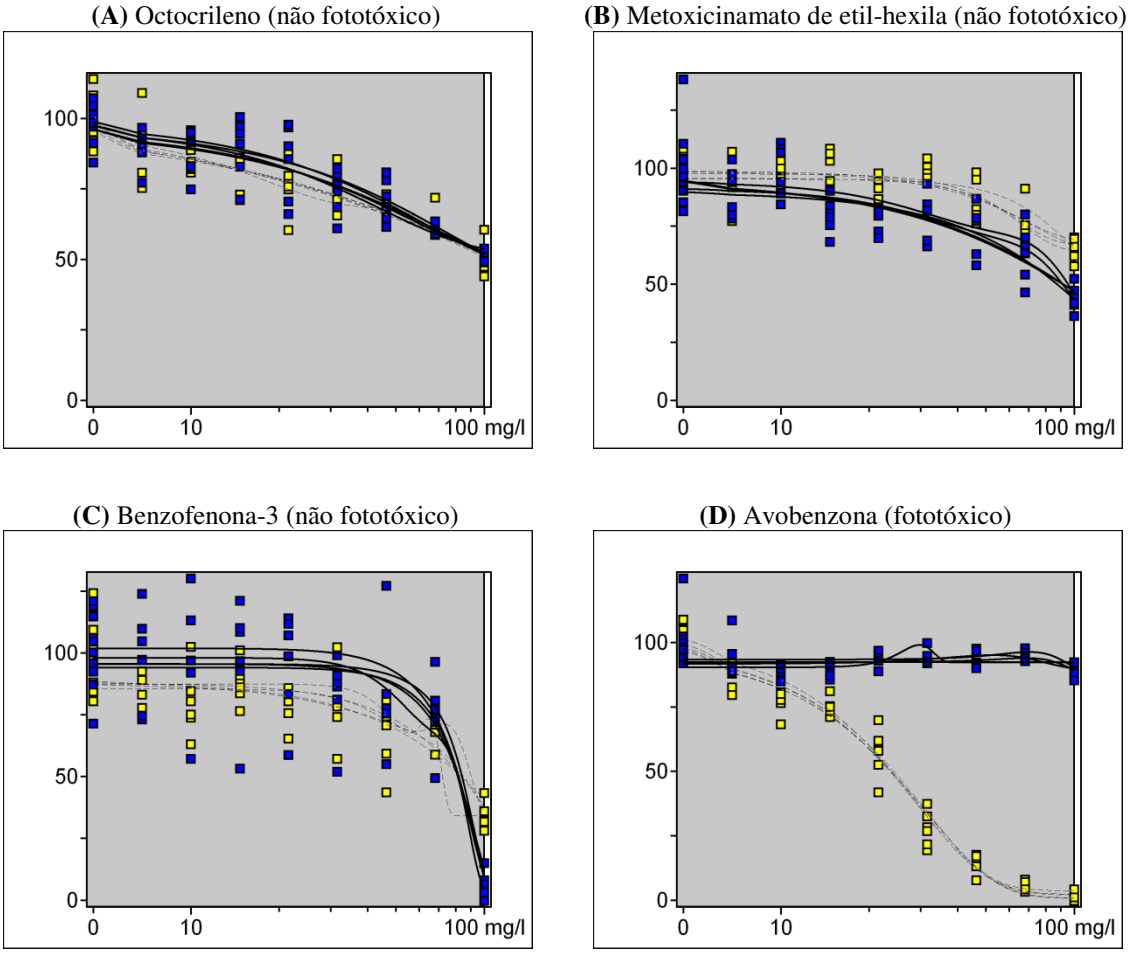
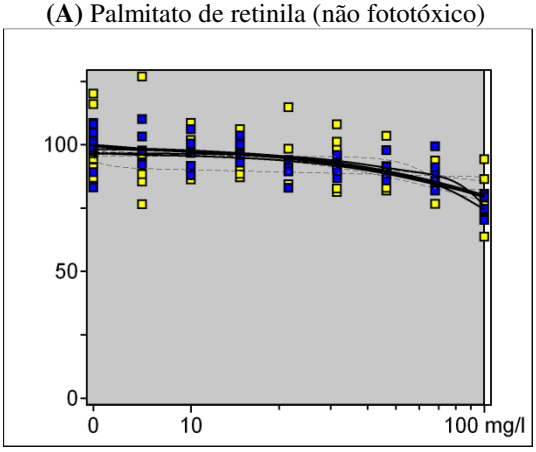


Figura 39 - Curvas dose-resposta dos filtros em estudos, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0).

(A) Palmitato de retinila (não fototóxico)



(B) Retinol (fototóxico)

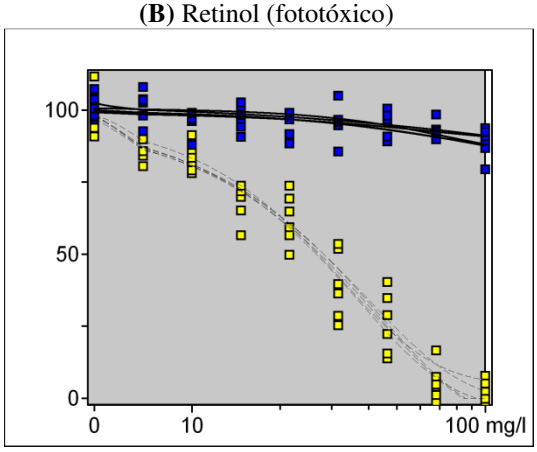
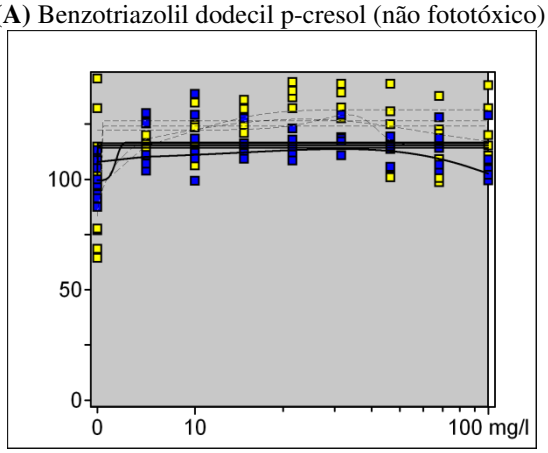
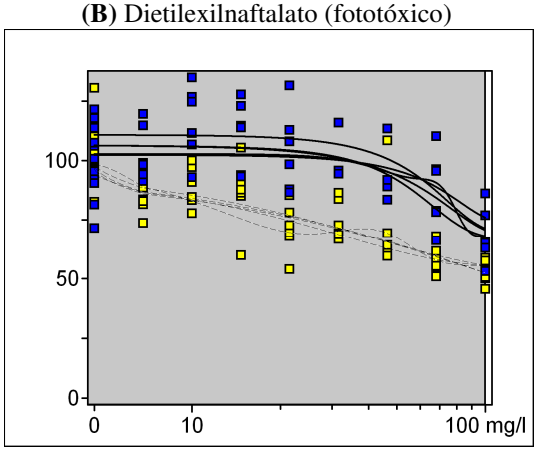


Figura 40 - Curvas dose-resposta das vitaminas em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0).

(A) Benzotriazolil dodecil p-cresol (não fototóxico)



(B) Dietilexilnaftalato (fototóxico)



(C) Bemotrizinol (não fototóxico)

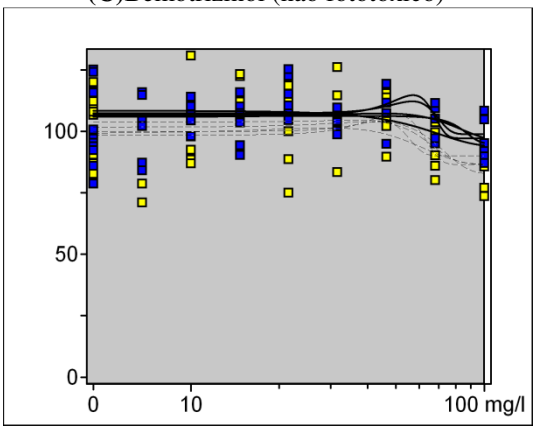


Figura 41 - Curvas dose-resposta dos estabilizadores em estudo classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0).

5.3.2. Análise das associações das substâncias em estudo

Os resultados obtidos na avaliação da fototoxicidade das associações em estudo estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Em relação às associações contendo a benzofenona-3, associadas aos diferentes estabilizadores em estudo e ao palmitato de retinila (Pr) e retinol (Ret), todas as associações foram consideradas não fototóxicas, pois apresentaram valores de MPE dentro dos valores aceitáveis para substâncias não fototóxicas.

Quando a associação contendo avobenzona (A5) foi analisada, observou-se valores de MPE abaixo do limiar de fototoxicidade indicado pelo guia da OECD (-0,007 e 0,027). Quando o palmitato de retinila e o retinol foram associados à A5, houve um aumento dos valores de MPE, o que classifica as associações A5Pr e A5 Ret como fototóxicas (A5Pr: 0,160 e 0,385; A5Ret: 0,785 e 0,104) (Tabela 13).

A presença do estabilizador benzotriazolil dodecil p-cresol nas associações contendo avobenzona e palmitato de retinila ou retinol, A6Pr e A6Ret, não levou à diminuição do potencial fototóxico dessas associações. Resultados semelhantes ocorreram com o estabilizador bemotrizinol, que não reduziu o potencial fototóxico das formulações contendo avobenzona e retinol (A8Ret) e sim apenas da associação avobenzona e palmitato de retinila (A8Pr)

Já a presença do dietilexilnaftalato nas associações contendo avobenzona e as vitaminas em estudo reduziu o seu potencial fototóxico, uma vez que as associações A7Pr e A7Ret não apresentaram potencial fototóxico.

Tabela 12. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo contendo Benzofenona-3 em cultura de fibroblastos (N = 2)

Associação	MPE	EC 50 (-UV) µg/mL	EC 50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
A1	-0,194 -0,046	ND 9,399	ND 16,023	1,000 0,587	Não fototóxico
A1Pr	0,017 -0,044	21,009 12,280	12,985 22,578	1,628 0,545	Não fototóxico
A1Ret	0,096 -0,054	70,069 18,785	11,816 28,047	6,394 0,677	Não fototóxico
A2	0,016 -0,057	ND 8,437	ND 17,463	1,000 0,484	Não fototóxico
A2Pr	-0,003 -0,017	34,662 15,423	ND 22,991	2,595 0,671	Não fototóxico
A2Ret	-0,182 0,006	5,160 9,018	20,591 6,769	0,251 1,353	Não fototóxico
A3	-0,021 -0,069	24,434 18,171	36,356 40,449	0,680 0,450	Não fototóxico
A3Pr	0,028 -0,070	29,768 6,259	18,236 24,456	1,638 0,259	Não fototóxico
A3Ret	0,007 -0,010	27,456 4,769	31,090 7,094	0,884 0,678	Não fototóxico
A4	-0,049 -0,031	ND 9,038	ND 13,616	1,000 0,665	Não fototóxico
A4Pr	0,071 -0,044	53,34 17,957	18,982 30,768	2,827 0,584	Não fototóxico
A4Ret	0,051 0,006	7,712 5,252	4,519 4,706	2,031 1,119	Não fototóxico

Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. [a]: Provavelmente fototóxico. [b]: Fototóxico.

Tabela 13. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo contendo avobenzona, em cultura de fibroblastos. (N = 2)

Associação	MPE	EC 50 (-UV) µg/mL	EC 50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
Associação 5	-0,007 0,027	20,992 41,933	25,871 25,666	0,812 1,634	Não fototóxico
Associação 5Pr	**0,160** [b] **0,385** [b]	ND ND	11,338 10,970	7,676 8,682	**Fototóxico**
Associação 5Ret	**0,785** [b] 0,104[a]	ND ND	4,565 ND	18,107 1.011	**Fototóxico**
Associação 6	-0,037 0,009	ND 19,661	ND 15,319	1,000 1,284	Não fototóxico
Associação 6Pr	**0,269** [b] **0,335** [b]	ND ND	ND 10,100	1,000 9,924	**Fototóxico**
Associação 6Ret	**0,381** [b] **0,174** [b]	ND 10,752	2,454 3,242	3,760 3,494	**Fototóxico**
Associação 7	0,028 0,049	14,711 54,576	14,609 31,094	1,009 1,779	Não fototóxico
Associação 7Pr	0,065 0,081	8,894 8.946	15,158 4.323	0,592 2.108	Não fototóxico
Associação 7Ret	0,069 0,073	ND 5,513	19,274 3,273	4,276 1,724	Não fototóxico
Associação 8	-0,052 -0,000	ND 18,257	ND 18,505	1,000 0,987	Não fototóxico
Associação 8Pr	0,065 0,080	5.598 30,426	4.598 12,455	1.226 2,453	Não fototóxico
Associação 8Ret	**0,482** [b] **0,247** [b]	58,276 15,865	7,682 3,843	7,630 7,669	**Fototóxico**

Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica (mais detalhes no item 4.2.4.2.). [a]: Provavelmente fototóxico. [b]: Fototóxico.

A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das associações em estudo, (Figuras 42 e 43) classificadas como fototóxicas e não fototóxicas, as quais foram geradas pelo Software Phototox versão 2.0.

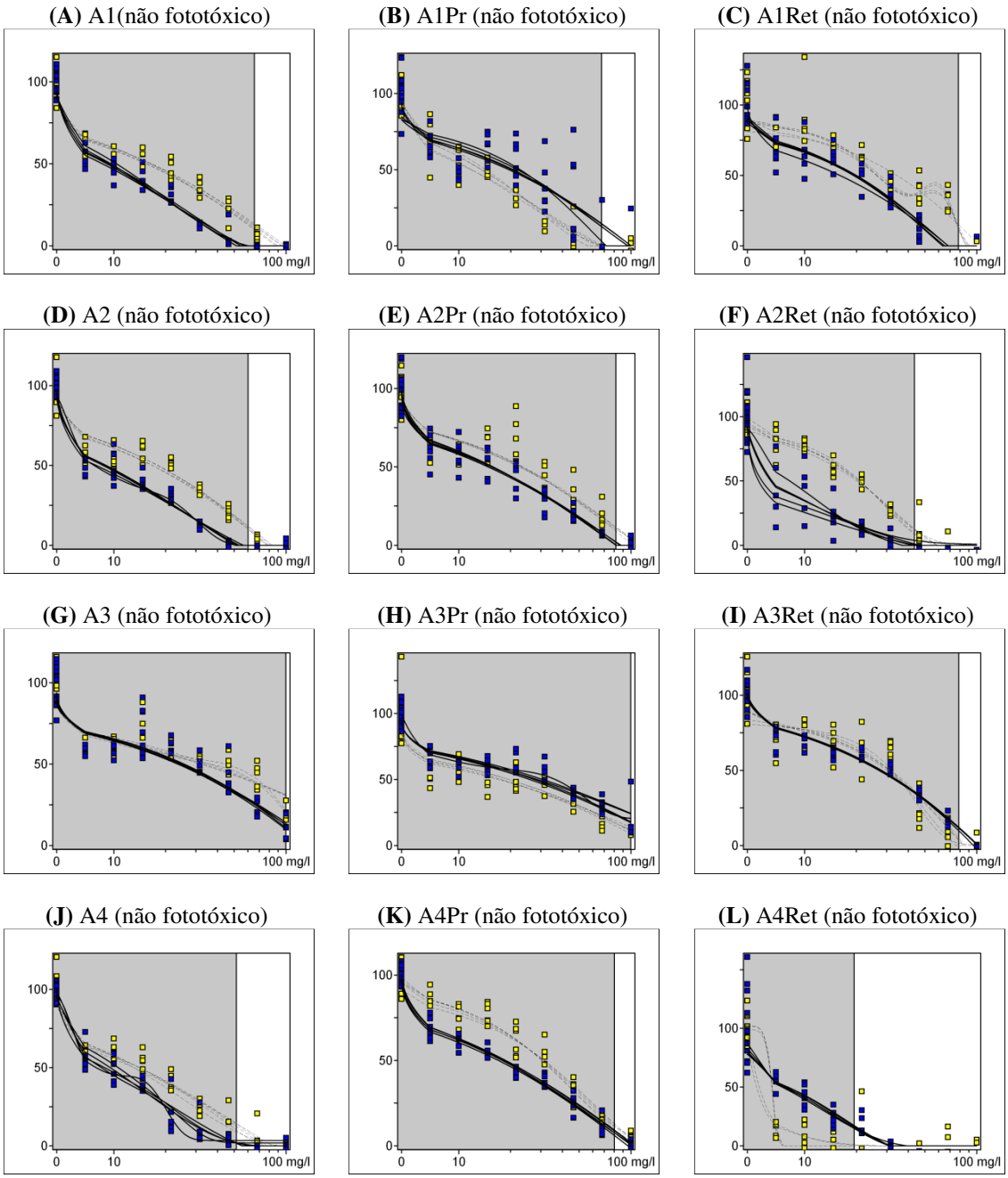


Figura 42 - Curvas dose-resposta das associações contendo benzofenona-3, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0).

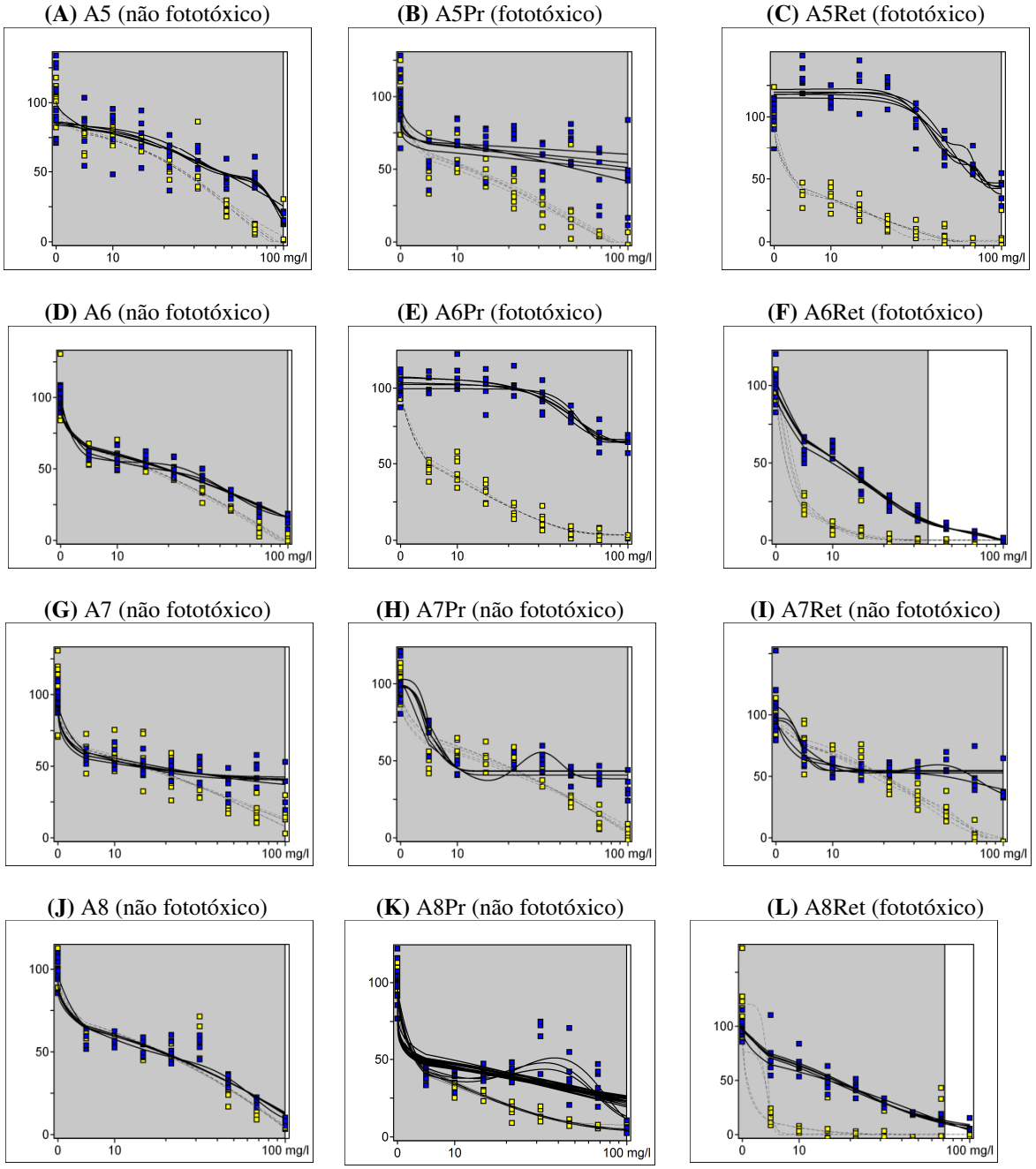
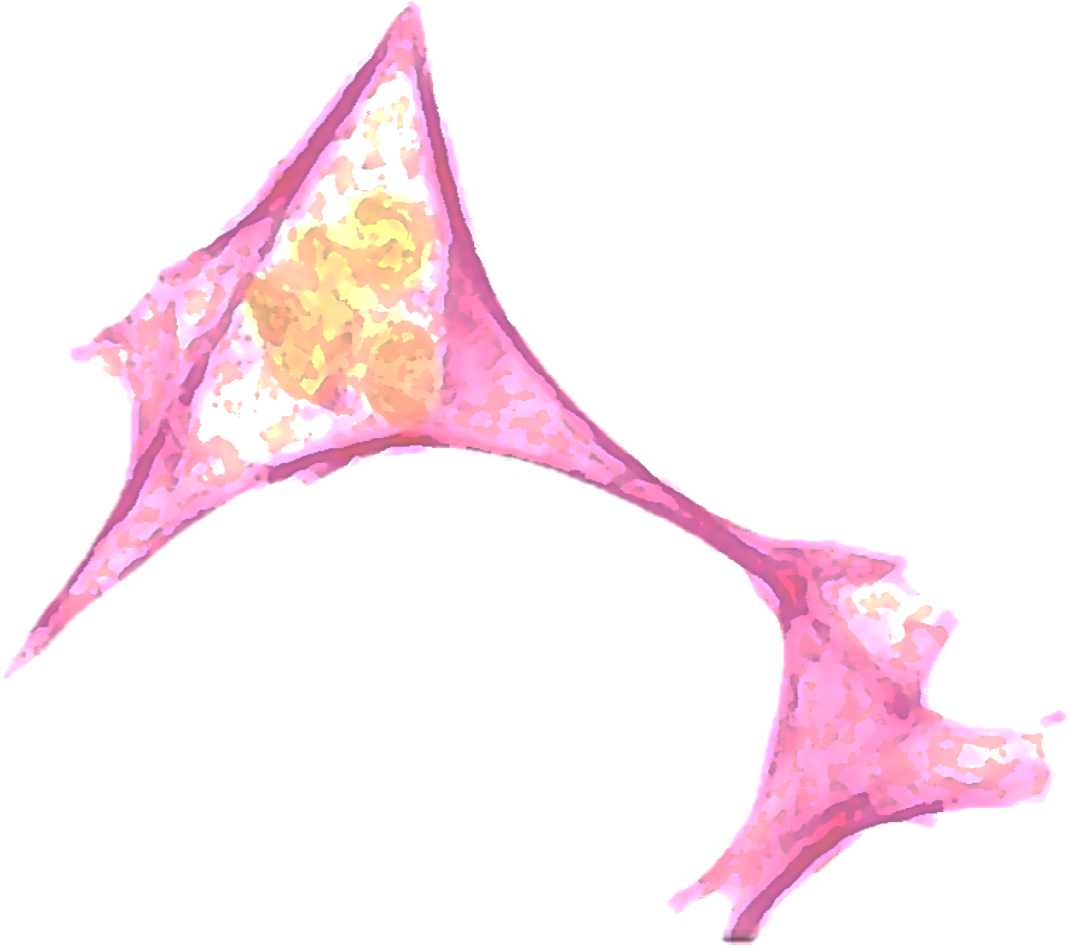


Figura 43 - Curvas dose-resposta das associações contendo avobenzona, classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos gerados pelo Software Phototox versão 2.0).



6. Discussão

Uma das características fundamentais para o filtro solar ideal é o fato de que este deve apresentar fotoestabilidade frente ao UV, pois um filtro solar que mostre fotolabilidade pode o levar a degradação, bem como promover fototoxicidade e fotoalergia. Além disso, o filtro ideal deve, além de apresentar estabilidade frente ao UV, prover ampla proteção ao consumidor, tanto frente ao UVB quanto ao UVA, sendo que para isto, é necessário que haja uma associação entre moléculas capazes de proteger a pele contra essas duas formas de radiação solar. No entanto, alguns filtros solares exibem certa fotorreatividade, como é o caso da avobenzona, que apesar de apresentar certa fotolabilidade, é amplamente utilizada por conta de sua alta absortividade e bom desempenho no UVA (SHAATH, 2010).

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados com a padronização das condições cromatográficas para a separação e análise dos filtros solares, estabilizadores e vitaminas nas associações empregadas nas formulações objeto de estudo e validação do método de análise. O método para a avaliação da fototoxicidade utilizando o CLAE foi considerado adequado, uma vez que os valores de precisão e exatidão/recuperação intra e inter-ensaio foram aceitáveis e o método foi considerado preciso e exato (ANVISA, 2003; CASS; DEGANI, 2001). O estudo de fototoxicidade também foi considerado adequado e dentro dos padrões preconizados pela OECD, pois os controles positivo e negativo apresentaram valores de MPE dentro da faixa aceita para o teste (OECD, 2004).

A avobenzona é uma molécula que apresenta tautomerização ceto-enólica. A absorção de um fóton pode levar a molécula da forma enólica predominante (AVOE) à forma dicetona (AVOK). Enquanto o tautômero AVOE tem um comprimento de onda de absorção máximo em 357nm, ou seja, um ótimo filtro UVA, a forma AVO^K absorve em 260-280nm, no UVC, perdendo assim grande parte da eficácia como filtro UVA (LHIAUBET-VALLET et al., 2010). Segundo dados da literatura, esta espécie AVO^K , quando excitada, é responsável pela maioria dos efeitos nocivos da avobenzona, uma vez que nessa forma é capaz de atingir o estado excitado tripleto, que pode gerar o oxigênio singleto, o qual é responsável pela formação de produtos de oxidação em materiais biológicos, devido sua alta reatividade.

A fotorreatividade da avobenzona, já bem descrita na literatura, foi a provável responsável pelos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, em relação à razão UVA/UVB obtida por espectrofotometria, que relaciona a proteção UVA e UVB, apenas a formulação contendo a avobenzona (F5) foi considerada fotoinstável quando submetida à radiação UV. Observou-se ainda que os três estabilizadores em estudo foram capazes de melhorar a fotoestabilidade das combinações contendo avobenzona (F6 a F8).

Ao contrário da avobenzona, a benzofenona-3, mesmo em combinações que não continham nenhum dos estabilizadores, foi considerada fotoestável (F1), uma vez que não houve alteração frente ao UV. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, que demonstram que formulações fotoprotetoras contendo avobenzona são considerados menos fotoestáveis que formulações contendo benzofenona-3 (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2004; 2006).

No entanto, quando comparamos a fotoestabilidade das formulações contendo os estabilizadores benzotriazolil dodecil p-cresol e dietilexilnaftalato, por meio do uso de CLAE, foi observado um efeito ligeiramente maior na proteção da combinação palmitato de retinila/avobenzona quando comparada com a associação palmitato de retinila/benzofenona-3. Este resultado, provavelmente deve-se ao fato de que a maioria dos estabilizadores presentes no mercado é delineada, mais especificamente, com o intuito de oferecer proteção das reações que ocorrem na molécula da avobenzona frente à exposição ao UV (BONDA; STEINBERG, 2000).

Em relação aos estudos de fototoxicidade, foi observado que a avobenzona apresentou potencial fototóxico, quando analisada isoladamente. Os resultados obtidos tanto no estudo de fotoestabilidade quanto no estudo de fototoxicidade, mostram que além da avobenzona ser considerada fotoinstável, esta substância apresentou potencial fototóxico, o que está de acordo com dados da literatura que descrevem suas diversas reações frente ao UV (LHIAUBET-VALLET et al., 2010; SHAATH, 2010).

Entretanto, quando essa substância foi combinada aos filtros solares (F5), esta associação não foi considerada fototóxica, o que provavelmente ocorreu devido à proteção oferecida pelo octocrileno, que além de filtro solar, também é considerado um estabilizador (MENDROK-EDINGER et al., 2009), além do fato de que nas associações entre filtros solares, há uma menor quantidade de avobenzona (proporcional ao contido em uma formulação cosmética), em relação ao utilizado para o teste da substância pura.

Outro aspecto muito importante em relação a formulações cosméticas estáveis é o emprego de vitaminas como antioxidantes. Já foi descrito na literatura que o retinol e seus ésteres têm um comprimento de onda máximo de absorção em 325 nm (FU et al., 2007), o que os leva a ter um amplo espectro de absorção tanto na faixa do UVA quanto do UVB. Apesar de ser considerada como um potente antioxidante, estudos mostram o potencial dessa vitamina em apresentar certa atividade prooxidante. Essa dualidade apresentada pela vitamina A está intimamente relacionada à sua exposição ao UV (FU et al., 2007).

Foi observado por estudos anteriores que, após um retinóide absorver um fóton, seu tempo de vida intrínseco de fluorescência foi cerca de 100 vezes mais longo do que o esperado (THOMSON, 1969; CHIHARA, 1979), sugerindo a existência de dois estados excitados singletos distintos (BECKER, 1988; OTTOLENGHI, 1980). Este longo tempo de fluorescência, por sua vez, leva a um aumento na probabilidade de ocorrerem transformações fotoquímicas envolvendo o estado excitado singleto, além de tornar os retinóides mais suscetíveis a reações com O_2 (FU et al., 2007).

Em relação ao estudo de fotoestabilidade por CLAE, quando as vitaminas foram acrescidas às formulações em estudo, foi observado que tanto na presença da benzofenona-3, quanto da avobenzona, houve degradação das vitaminas, com consequente diminuição da porcentagem remanescente das mesmas, o que está de acordo com dados da literatura, que mostram a labilidade da vitamina A e seus ésteres frente à radiação UV (FU et al., 2007).

O bemotrizinol foi considerado o melhor estabilizador para ambas as vitaminas, por ter conferido a maior proteção às vitaminas frente à radiação UV. Este fato pode ser explicado por três principais razões.

A princípio, quando um elétron de um cromóforo absorve um fóton, vai para o estado excitado, podendo então percorrer diversas vias fotoquímicas para ser desativado e voltar ao estado fundamental, sendo que há uma competição entre os possíveis processos fotoquímicos cuja molécula pode percorrer (BONDA, 2010). Em relação aos retinóides, uma das possíveis vias que podem percorrer é o cruzamento intersistemas, atingindo o estado excitado tripleto, que pode levar a diversos processos fotoquímicos e à formação de oxigênio singleto.

No presente estudo, o bemotrizinol foi utilizado como estabilizador de filtros solares e apresentou ótimos resultados. Uma possível razão para isso é que o bemotrizinol é um dos principais estabilizadores do estado excitado tripleto, ou seja, o bemotrizinol é exatamente um *quencher* do estado excitado tripleto (SHAATH, 2010; BONDA, 2010), o qual é capaz de atuar como um aceptor de energia para moléculas que atingem esse estado excitado. Dessa forma, esse foi o primeiro mecanismo provável de estabilização dos retinóides, através *quenching* do estado excitado tripleto pelo bemotrizinol.

Além disso, outro mecanismo que pode ter ocorrido é baseado em duas características fundamentais da molécula do bemotrizinol que, ao contrário dos outros estabilizadores, apresenta um alto coeficiente de absortividade molar bem como, uma ampla faixa de absorção no UV (SHAATH, 2010).

O bemotrizinol apresenta um espectro de absorção de 280-380nm (SHAATH, 2010), sendo que exibe picos de absorção tanto no UVB ($\lambda_{máx}$ = 310nm), quanto no UVA ($\lambda_{máx}$ =

343nm) devido à sua estrutura hidroxifeniltriazina (TUCHINDA, 2006). Esse amplo espectro de absorção é capaz de abranger exatamente o espectro de absorção dos retinóides, uma vez que o comprimento de onda máximo de absorção dos retinóides é de 325nm (FU et al., 2007).

Além disso, devido à sua estrutura com múltiplos cromóforos, o bemotrizinol além de absorver em uma ampla faixa do espectro do UV, também apresenta um alto coeficiente de absortividade molar (ε), sendo que para o UVB ($\lambda_{máx}$ = 310nm), apresenta um ε = 46.800dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} e para o UVA ($\lambda_{máx}$ = 343nm) apresenta um ε = 51.900dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} (SHAATH, 2010). Esses altos coeficientes fazem com que o bemotrizinol seja capaz de competir pela absorção dos fótons com os retinóides, diminuindo a probabilidade de haver a excitação e consequente degradação dessas moléculas e formação de fotoprodutos.

No estudo de razão UVA/UVB por espectrofotometria, quando as formulações contendo avobenzona associada às vitaminas em estudo (F5Pr e F5Ret) foram analisadas, ambas as formulações também foram consideradas fotoinstáveis, por apresentarem uma queda significativa da razão UVA/UVB.

Quando foram analisados os dados de fototoxicidade, observou-se que o retinol apresentou potencial fototóxico enquanto o palmitato de retinila não apresentou.

Estudos relatam que o palmitato de retinila é considerado como sendo quimicamente e termicamente mais estável que o retinol (IDSON, 1990), sendo que o palmitato de retinila é frequentemente utilizado em formulações cosméticas. No entanto, o retinol, é muito suscetível a oxidação, por ser um polieno, que, ainda, contém um álcool primário que é facilmente oxidável, grupamento que não está presente no palmitato de retinila, já que apresenta esse grupamento substituído por uma ligação éster, tornando o grupo alcoólico bloqueado (CRANCK; PARDIJANTO, 1995), retirando, assim, o grupo mais passível de ser oxidado da molécula. Com a formação de espécies reativas do oxigênio, estas encontram um alvo fácil no retinol, o grupo álcool primário, oxidando-a e levando a subprodutos que devem ser a causa da fototoxicidade apresentada pelo retinol.

Em relação ao palmitato de retinila, apesar dessa vitamina não ter apresentado potencial fototóxico isoladamente, quando foi associada à combinação contendo avobenzona (A5Pr), foi observado que a associação apresentava potencial fototóxico. O que indica um possível efeito sinérgico do palmitato de retinila na fototoxicidade das associações de filtros solares contendo avobenzona. A combinação do retinol com a associação A5, o que formou a associação A5Ret também apresentou potencial fototóxico.

Considerando a alta reatividade da avobenzona, que pode levá-la ao estado excitado tripleto e que neste estado ela consegue transferir energia para o oxigênio fazer o cruzamento

intersistemas tornando-se singleto, que é responsável pelos danos biológicos dos intermediários reativos do oxigênio, é necessário que o estabilizador de alto desempenho consiga prevenir que a avobenzona alcance esse estado excitado. Isso pode ser obtido quando o próprio estabilizador chega ao estado excitado tripleto (CHATELAIN; GABARD, 2010), seja por transferência de elétrons, ou por transferência de energia, ambos vindos da avobenzona em estado excitado (SHAATH, 2007).

A maioria dos estabilizadores normalmente utilizados como filtros, como é o caso do octocrileno e do dietilexilnaftalato, funciona como aceptor de energia do estado excitado tripleto. Essas moléculas são projetadas e desenvolvidas de modo que um doador fotoinstável (como a avobenzona) no estado excitado tripleto possa ser estabilizado por ele, antes mesmo que uma reação fotoquímica possa ocorrer com a molécula fotoinstável (SHAATH, 2007), impedindo reações de propagação dos radicais livres.

O estabilizador dietilexilnaftalato apresentou potencial fototóxico quando estava isolado porém, quando combinado à associação contendo avobenzona (F7), foi considerado não fototóxico para ambas as vitaminas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato que este estabilizador foi especificamente delineado para agir em conjunto com a molécula da avobenzona, estabilizando-a.

Dentre os mecanismos de fotoestabilização promovidos pelos estabilizadores de filtros solares, podem ocorrer resumidamente dois tipos, baseado na competição pelos fótons ou baseado na transferência de energia, que é o mecanismo dos *quenchers*, já descrito anteriormente. No caso dos estabilizadores de filtros solares que são também bons absorvedores do UV, os dois mecanismos estão presentes. Porém, no caso do dietilexilnaftalato, o único mecanismo apresentado é o de transferência de energia, já que este estabilizador não é um bom absorvedor no UV, uma vez que apresenta um baixo coeficiente de absortividade molar no UVB ($\lambda_{máx}$ = 290nm), ε = 9.000dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}, e ainda mais baixo no UVA ($\lambda_{máx}$ = 332nm e 350nm), ε = 1.000dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} e 2.000dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}, respectivamente, os quais são irrelevantes quando comparados ao ε = 34.140dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} apresentado pela avobenzona ($\lambda_{máx}$ = 357nm) (TUCHINDA, 2006; SHAATH, 2010). Desse modo, o dietilexilnaftalato só pode agir como um efetivo estabilizador quando estiver na presença de uma molécula instável como a avobenzona.

Os estudos de fotoestabilidade por espectrofotometria indicaram que as formulações contendo a associação avobenzona / benzotriazolil dodecil p-cresol / retinol (F6Ret), a associação avobenzona / bemotrizinol / palmitato de retinila (F8Pr) e a associação avobenzona / bemotrizinol / retinol (F8Ret), foram consideradas fotoestáveis. Entretanto

quando a fotoestabilidade foi analisada pela quantificação da porcentagem remanescente das vitaminas por CLAE, apenas o estabilizador bemotrizinol foi considerado o melhor estabilizador tanto para o palmitato de retinila (F4Pr) quanto para o retinol (F4Ret e F8 Ret).

Quando os resultados do estudo de fototoxicidade foram analisados, o estabilizador benzotriazolil dodecil p-cresol não ofereceu proteção contra a fototoxicidade gerada pela combinação vitaminas e avobenzona.

Já o estabilizador bemotrizinol apenas ofereceu proteção para a combinação palmitato de retinila / avobenzona, mas não foi capaz de prevenir a proteção da combinação retinol / avobenzona. Analisando esses resultados, podemos sugerir algumas hipóteses. Primeiramente, o palmitato de retinila, quando analisado isoladamente, não foi considerado fototóxico, mas, quando combinado com a avobenzona, fototóxica, formou a associação A5Pr, que foi considerada fototóxica. O estabilizador bemotrizinol conseguiu estabilizar essa combinação e diminuir sua fototoxicidade. Entretanto, quando a mesma combinação foi feita utilizando ao invés de palmitato de retinila, o retinol, essa combinação se manteve fototóxica mesmo na presença do bemotrizinol, uma vez que tanto o retinol, quanto a avobenzona eram fototóxicos isoladamente e devem ainda ter apresentado um efeito sinérgico na fototoxicidade, de forma que o estabilizador bemotrizinol não foi capaz de os estabilizar.

Além disso, outra hipótese está relacionada às suas propriedades físico-químicas, uma vez que o estabilizador bemotrizinol é muito lipossolúvel, e que estabilizaria melhor o palmitato de retinila que o retinol, pois o éster palmitato é mais lipossolúvel que o retinol.

Considerando esses resultados obtidos em relação aos diferentes estabilizadores e analisando a diferente performance de cada um na proteção da fotoestabilidade e da fototoxicidade, podemos observar que um estabilizador de filtros solares pode melhorar a fotoestabilidade de formulações sem necessariamente reduzir a fototoxicidade produzida por subprodutos tóxicos formados em interações entre as substâncias associadas e submetidas ao UV, uma vez que alguns produtos de degradação e espécies reativas de oxigênio possivelmente formadas durante a exposição à radiação UV não podem ser quantificadas por técnicas tradicionais tais como a CLAE.

Por outro lado, as associações de avobenzona / vitaminas e avobenzona /retinol, com os estabilizadores benzotriazolil dodecil p-cresol e bemotrizinol, respectivamente, mesmo tendo apresentado potencial fototóxico no presente estudo, podem não apresentar fototoxicidade *in vivo*, pois a biodisponibilidade também deve ser levada em consideração para predizer o potencial fototóxico de uma substância ou associação.

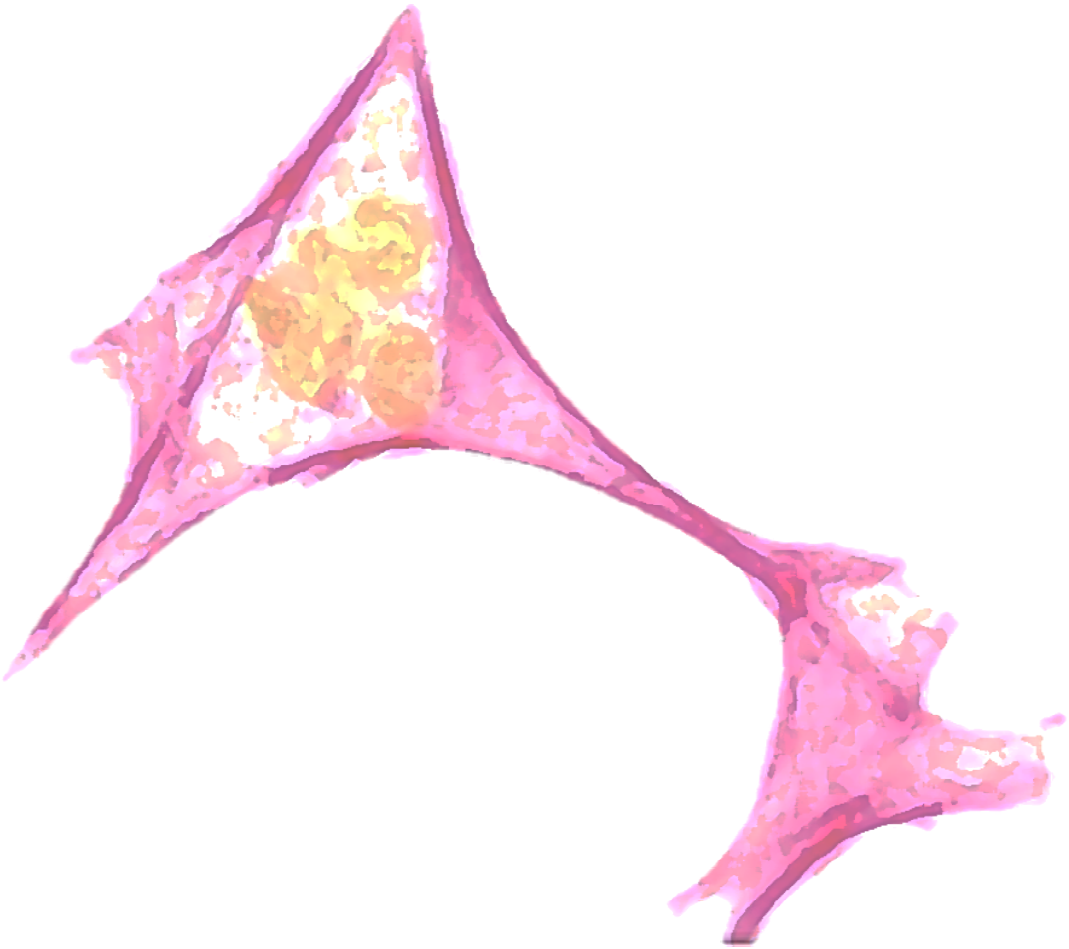
Estudos anteriores mostram que os resultados obtidos com óleo de bergamota no estudo de fototoxicidade 3T3 NRU PT em monocamadas e em modelo de pele humana reconstituída apresentaram uma boa correlação, ou seja, o óleo de bergamota de 2 diferentes fabricantes foi classificado como potencialmente fototóxico no teste 3T3 e a sua fototoxicidade foi confirmada nos ensaios no modelo de pele reconstituída (KANĎÁROVÁ, 2006; KEJLOVÁ et al., 2007). Entretanto, essa correlação entre os resultados obtidos nos estudos em cultura de células e na pele reconstituída não foi observada quando a avobenzona foi avaliada, pois, apesar desse filtro solar ter sido classificado como potencialmente fototóxico no teste 3T3, ele não apresentou fototoxicidade nos ensaios no modelo de pele reconstituída, o que, segundo os autores provavelmente pode ter ocorrido devido à sua baixa biodisponibilidade na epiderme viável (KANĎÁROVÁ, 2006).

Após vários estudos da comunidade internacional para a validação de métodos alternativos para a análise da fototoxicidade, os quais tiveram o apoio de diferentes órgãos tais como a ECVAM, a COLIPA e o ZEBET, o teste de fototoxicidade 3T3 NRU em monocamadas foi validado, e aceito pela Comunidade Européia, pela OECD e pelo FDA para fins regulatórios. Uma vez que os fibroblastos são muito sensíveis a radiação UV, a desvantagem desse teste é a presença de resultados falso-positivos, o que tem sido sanado com a indicação de testes complementares em modelo de pele humana reconstituída no caso de resultados positivos no teste em monocamadas (LIEBSCH et al., 2005). No entanto, se uma substância não apresentar potencial fototóxico agudo na cultura de fibroblastos, seguramente não apresentará fototoxicidade *in vivo* (OECD, 2004).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa corroboram com os estudos anteriormente citados, uma vez que foi observado que as associações contendo benzotriazolil dodecil p-cresol e dietilexilnaftalato foram capazes de proteger a pele de camundongos sem pêlo contra inflamação e danos causados pelo UV (BENEVENUTO et al., 2010).

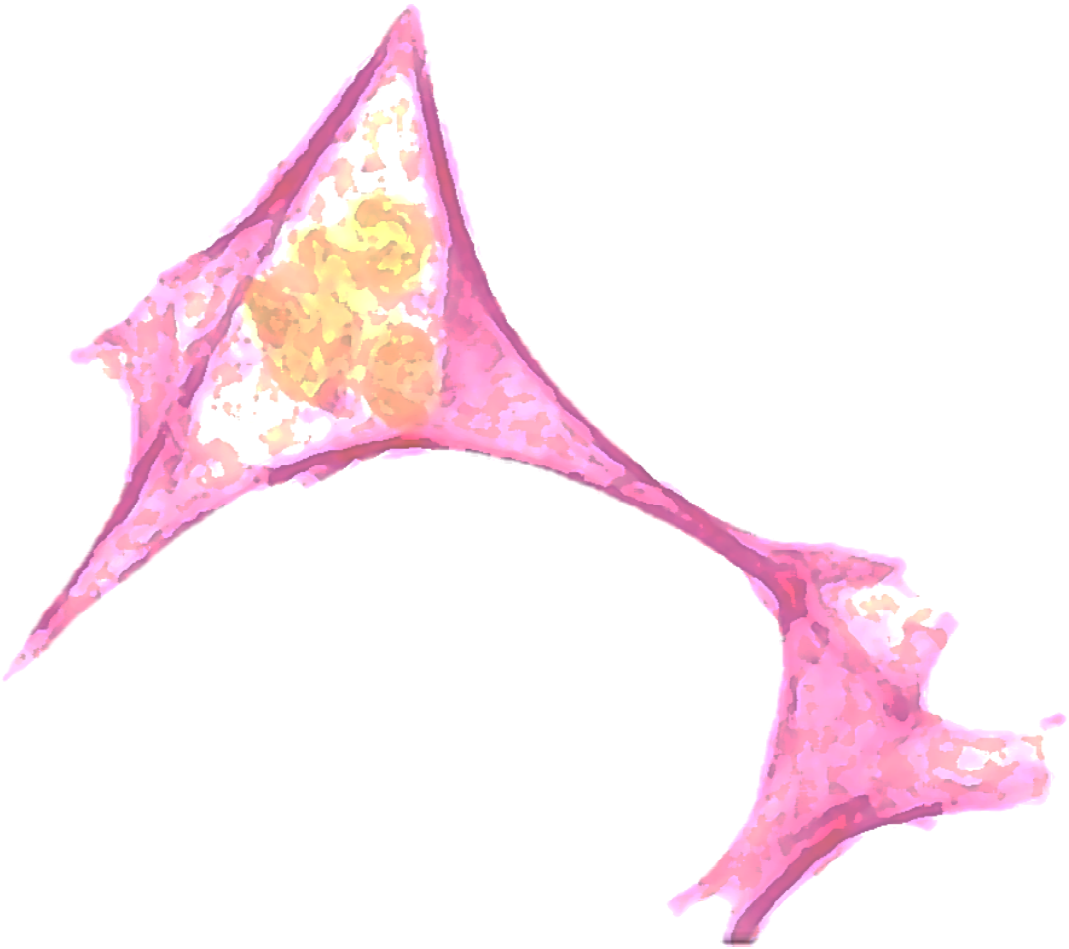
Os resultados encontrados no presente estudo são promissores uma vez que, apesar de algumas associações de filtros solares / estabilizadores / vitaminas terem sido consideradas fotoinstáveis quando o teor de vitaminas ou absorção no UV foi avaliado, essas associações não apresentaram potencial fototóxico no estudo de fototoxicidade em cultura de fibroblastos. Por outro lado, outras associações consideradas fotoestáveis nos testes anteriormente citados, apresentaram potencial fototóxico, sugerindo a formação de produtos de degradação e espécies reativas de oxigênio, durante a exposição à radiação UV, que provocaram danos às células. No entanto é necessária a realização de outros estudos que levam em consideração a

permeação cutânea dos filtros solares e vitaminas que apresentaram potencial fototóxico, para se assegurar a real fototoxicidade das associações em estudo.



7. Conclusão

- Todas as formulações se mostraram estáveis nos testes preliminares de estabilidade.
- Em relação à padronização da CLAE das 8 substâncias de interesse, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou eluição por gradiente em que, inicialmente, o gradiente foi mantido isocrático por 53 minutos com 74% de uma mistura metanol:isopropanol (55:45 – v/v) como solvente A e 26% de água como solvente B; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 4 minutos atingindo 0% de água (solvente B) e mantido isocrático durante 44 minutos.
- Em relação ao estudo de fotoestabilidade por CLAE e por espectrometria na região do UV, os estudos indicaram que os estabilizadores de filtros solares influenciaram a fotoestabilidade de ambas as vitaminas em estudo. No estudo por CLAE, o bemotrizinol foi considerado o melhor estabilizador para ambas as vitaminas, tanto quando o retinol estava associado à benzofenona-3 e avobenzona quanto quando o palmitato de retinila estava associado à benzofenona-3. No estudo por espectrofotometria no UV, as formulações contendo avobenzona / vitaminas foram consideradas fotoinstáveis, e apenas o bemotrizinol aumentou a fotoestabilidade da avobenzona associada a ambas as vitaminas.
- O estudo de fototoxicidade realizado em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT) mostrou que a avobenzona, o dietilexilnaftalato e o retinol apresentaram potencial fototóxico. Quando as associações dos filtros solares / vitaminas foram analisadas, apenas as que continham avobenzona / palmitato de retinila e avobenzona / retinol foram consideradas fototóxicas. A presença do estabilizador dietilexilnaftalato reduziu o potencial fototóxico de ambas as associações avobenzona / vitaminas e o estabilizador bemotrizinol reduziu o potencial fototóxico da associação avobenzona / palmitato de retinila.
- Os resultados encontrados no presente estudo são promissores uma vez que algumas associações consideradas fotoestáveis apresentaram potencial fototóxico, mostrando a importância da realização de ambos os estudos no desenvolvimento / avaliação de formulações fotoprotetoras estáveis e seguras ao uso.



8. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Resolução n. 30, de 1° de junho de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de junho de 2012. Seção 1, p.83-84.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Utilização de Retinóides em Produtos Cosméticos. Parecer Técnico CATEC nº 4, de 21 de dezembro de 2010.

ALLEN, J.M.; GOSSETT, C.J.; ALLEN, S.F. Photochemical formation of singlet molecular oxygen ($^1O^2$) in illuminated aqueous solutions of p-aminobenzoic acid (PABA). **J Photochem Photobiol B,** v. 32, n.1–2, p.33–37, 1996.

ANTILLE, C.; TRAN, C.; SORG, O.; CARRAUX, P.; DIDIERJEAN, L.; SAURAT, J.H. Vitamin A exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet B radiation. **J Invest Dermatol**, v.121, n.5, p.1163-1167, 2003.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer J. **Photochem Photobiol B, Biol,** v.63, p.8-18, 2001.

AVENEL-AUDRAN, M.; DUTARTRE, H.; GOOSSENS, A.; JEANMOUGIN, M.; COMTE, C.; BERNIER, C.; BENKALFATE, L.; MICHEL, M.; FERRIER-LEBOUËDEC, M.C.; VIGAN, M.; BOURRAIN, J.L.; OUTTAS, O.; PEYRON, J.L.; MARTIN, L. Octocrylene, an Emerging Photoallergen. **Arch Dermatol,** v.146, n.7, p.753-757, 2010.

BECKER, R.S. The Visual Process: Photophysics ans photoisomerization of model visual pigments ant the primary reaction. **Photochem. Photobiol.** v.48, p.369-399, 1988.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression**. J Investig Dermatol Symp Proc,** v.4, p. 61–64. 1999

BENEVENUTO, C. G.; DI MATTEO, M. A. S.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; GASPAR, L. R. Influence of the Photostabilizer in the Photoprotective Effects of a Formulation Containing UV-Filters and Vitamin A. **Photochem Photobiol**, v. 86, p.1309-1396, 2010.

BENJAMIN, C.L.; ANANTHASWAMY, H.N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 224, p. 241–248, 2007.

BERSET, G.; GOZENBACH, H.; CHRIST, R.; MARTIN, R.; DEFLANDRE, A.; MASCOTTO, R.E.; JOLLEY, J.D.R.; LOWELL, W.; PELZER, R.; STIEHM, T. Proposed protocol for determination of photostability Part I: cosmetic UV filters. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.18, p.167-177, 1996.

BERTON, T.R.; PAVONE, A.; FISCHER, S.M. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis *in vivo*. **J Invest Dermatol.** v.17, p.1171–1178, 2001.

BONDA, C. Sunscreen vs. Photostabilizer (2007). Disponível em: http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/category/suncare/10377137.html?page=1. Acesso em 01 de julho de 2012.

BONDA, C.; PAVLOVIC, A.; HANSON, K.; BARDEEN, C. Singlet Quenching Proves Faster is Better for Photostability. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v.125, n. 2, p. 40-48, 2010.

BONDA, C.; STEINBERG, D. C. A new photostabilizer for full spectrum sunscreens. **Cosmet. and Toiletries**, v.115, n.6, p.37–45, 2000.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, Brasília, 9 outubro de 2008.

BRENNER, M.; HEARING, V.J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochem Photobiol,** v.84, p.539–549, 2008.

BURNETT, M.E.; WANG, S.Q. Currentt sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatol, Photoimmunol & Photomed**, v.27, p.58-67, 2011.

CAMBON, M.; ISSACHAR, N.; CASTELLI, D.; ROBERT, C. An *in vivo* method to assess the photostability of UV filters in a sunscreen. **J. Cosmet. Sci**., v.52, p.1–11, 2001.

CASS, C.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC - Fundamentos, Estratégias e Validação.** São Carlos; EdUFSCar, 77p., 2001.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butylmethoxy dibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyltriazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochem Photobiol,** v.74, n.3, p.401-406, 2001.

CHATELAIN, E.; GABARD, B.; SURBER, C. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v.16, n.1, p. 28–35, 2003.

CHAUDHURI, R.K.; LASCU, Z.; PUCCETTI, G.; DESHPANDE, A.A.; PAKNIKAR, S.K. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. **Photochem Photobiol**, v.82, n.3, p.823-828, 2006.

CHIHARA, K.; TAKEMURA, T.; YAMAOKA, N.; YAMAMOTO, A.; SCHAFFER, A.; BECKER, R.; Visual pigments-10. Spectroscopy and photophysical dynamics of retinol and retinyl ether. **Photochem Photobiol,** v. 29, p. 1001–1008, 1979.

COLIPA sun protection factor test method. Ref. 94/289. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association — COLIPA; Rue du Congre`s, Brussels; Oct. 1994.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Decisão da Comissão, de 9 de Fevereiro de 2006 , que altera a Decisão 96/335/CE que estabelece um inventário e uma nomenclatura comum dos ingredientes utilizados nos produtos cosméticos. L 97, Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, 05 de abril de 2006.

CRANCK, G.; PARDIJANTO, M. S.; Photo-oxidations and photosensitized oxidations of vitamin A and it palmitate ester, **Photochem Photobiol**, v.85, p.93-100, 1995.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **J Photochem Photobiol B**., v.82, n.3, p.204-213, 2006.

DARVAY, A.; WHITE, I.R.; RYCROFT, R.J.; HAWK, J.L.; McFADDEN, J.P. Photoallergic contact dermatitis is uncommon. **Br J Dermatol**, v.145, n.4, p.597–601, 2001.

DEFLANDRE, A.; LANG, G. Photostability assessment of sunscreens. Benzylidene camphor and dibenzoylmethanederivatives. **Int J Cosmet Sci**, v.10, p.53-62, 1988.

DIEPGEN, T.L.; MAHLER, V. The epidemiology of skin cancer. **Br J Dermatol**, v.61, p.1–6, 2002.

DIFFEY, B.L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **Int J Cosmet Sci**, v.16, p.47-52, 1994.

DROMGOOLE, S.H.; MAIBACH, H.I. Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitization and contact urticaria. **J Am Acad Dermatol,** v.22, p. 1068–1078, 1990.

ENVIRONMENTAL WORKING GROUP. Disponível em: http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/700596/AVOBENZONE/. Acessado em 11 de julho de 2007

FOOD AND DRUG ADMNISTRATION. Federal Register. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Proposed Amendment to the Final Monograph; Proposed Rule. CFR 21, v.72, n.165, parts 347–352, 49071–49122, 2007.

FENAME Dicionário Escolar FENAME – 6°ed. Ministério da Cultura, 1957.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **J Am Acad Dermatol**, v.58, n.5 Suppl 2, p.133-138, 2008.

FU, P.P.; XIA, Q.; YIN, J.J.; CHERNG, S.H.; YAN, J.; MEI, N.; CHEN, T.; BOUDREAU, M.D., HOWARD, P.C., WAMER, W.G. Photodecomposition of Vitamin A and Photobiological Implications for the Skin. **Photochem Photobiol**, v.83, p.409-424, 2007.

GAMAGE, D.A.; FAWZY, A.A.; FRASON, R.C. Preferential hydrolysis of peroxidized phospholipid by liposomal phospholipase. **Biochim Biophys Acta**, v.958, p.116-124, 1988.

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

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of different UV filters associations in a sunscreen**. Int J Pharm**, v.307, n.2, p.123-128, 2006.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Patente nº 8761205-49 "Composição fotoprotetora a base de filtros solares fotoestáveis e sua aplicação" (2004).

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm**, v. 343, n.1-2, p.181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; NAKANO, A.; DOS SANTOS, I.M.N.S.R; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of *in vitro* photostability of different sunscreens and its influence on *in vivo* SPF. In: 24th IFSCC Congress Osaka 2006.

GASPARRO, F.P. UV-induced photoproducts of paraaminobenzoid acid. **Photodermatol,** v.2, n.3, p.151 –157, 1985.

GERBERICK, G.F.; RYAN, C.A. Contact photoallergy testing of sunscreens in guinea pigs. **Contact Dermatitis,** v.20, n.4, p.251–259, 1989.

GERHARD; NOHYNEK, G.J.; SCHAEFERY, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regul Toxicol Pharmacol,** v.33, p.285–299, 2001.

GILCHREST, B.A.; ELLER, M.S.; GELLER, A.C.; YAAR, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med,** v.340, p.1341–1348, 1999.

GLANZ, K.; BULLER, D.B.; SARAIYA, M. Reducing ultraviolet radiation exposure among outdoor workers: state of the evidence and recommendations. **Environ Health**, v.6, p.22, 2007.

HAYDEN, P.J.; AYEHUNIE, S.; JACKSON, G.R.; KUPFER-LAMORE, S.; LAST, T.J.; KLAUSNER, M.; KUBILUS, J. In vitro skin equivalent models for toxicity testing MatTek Corporation, Ashland, MA, U.S.A. **Alternative Toxicological Methods,** p.229-247, 2003.

HERZOG, B. Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model. **J Cosmet Sci,** v.53, p.11–26, 2002.

HORNUNG, R.L. Photoprotection. In: IRVINE, A.D.; HOEGER, P.H.; YAN, A.C. Harper´s Textbook of Pediatric Dermatology, 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd. 2011.

IDSON, B. Vitamins in cosmetics, an update I Overview and Vitamin A. **Drug Cosmet Ind,** v.146, p.26-91, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: www.inca.gov.br, Acesso em novembro de 2011.

JANJUA, N.R.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, A.M.; PETERSEN, J.H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, N.E.; WULF, H.C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **J Invest Dermatol,** v.123, n.1, p.57– 61, 2004.

JIANG, R.; ROBERTS, M.S.; COLLINS, D.M.; HALLER, V.; STEINMANN, B.; LICHTENSTEIGER, W. Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. **Br J Clin Pharmacol,** v.48, n.4, p.635 – 637, 1999.

KANDÁROVÁ, H. Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology. 158p. PhD Thesis - Department of Biology, Chemistry and Pharmacy - Freie Universität Berlin, Berlin, 2006

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDOVÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁROVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. **Toxicol In Vitro,** v.21, n.7, p.1298-1303, 2007.

KENNEDY, C.; BAJDIK, C.D.; WILLEMZE, R; DE GRUIJL, F.R.; BOUWES BAVINCK, J.N. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. **J Invest Dermatol,** v.120, p.1087–1093, 2003.

KUMLER, W.D.; DANIELS, T.C. Sunscreen compounds. **J Am Pharm Assoc Sci Ed,** v.37, p.474–476, 1948.

LAVKER, R. M.; VERES, D.; IRWIN, C. J.; KAIDBEY, K. H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochem. Photobiol,** v.62, p.348–352, 1995.

LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRULLASB, C.; MIRANDA, M. A. Filter–filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen, **Photochem Photobiol Sci**, v.9, p.552-554, 2010.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. INVITTOX Protocol No. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database, 1998. Last update October 2002. <http://ecvamsis.jrc.it/invittox/static/index.html>.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H.; PAPE, W.; KRUL, C.; DEGUERCY, A.; ESKES, C. UV-induced effects. **Altern Lab Anim**, v.33, p.131-146, 2005.

LIM, H.W. DRAELOS, Z.D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection**. Informa Healthcare USA, Inc. New York. 322p., 2009.

MA, R.; COTTON, B.; LICHTENSTEIGER, W; SCHLUMPF, M. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. **Toxicol Sci,** v.74, n.1, p.43 –50, 2003.

MacEACHERN, W.N.; JILLSON, O.F. A practical sunscreen 'Red Vet Pet'. **Arch Dermatol**, v.89, p.147–150, 1946.

MACKIE BS, MACKIE LE. The PABA story. **Australas J Dermatol,** v.40, p.41–53, 1999.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; RICCI, G.; SEMPRINI, M.; LOPES, R. A. Histopathological, Morphometric And Stereological Studies Of Dermocosmetic Skin Formulations Containing Vitamin A And/Or Glycolic Acid.**J. Cosmet. Sci**., v.50, n. M/J, p. 159-170, 1999.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; CLEPF, S.; CAMARGO JR, F.B.; ANCONI, G.; GIANETI, M.D.; GASPAR, L.R. Objective clinical evaluation of cosmetic formulations containing vitamins A, C and E. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto (TF 200).

MARROT, L.; BELAÏDI, J.P.; LEJEUNE, F.; MEUNIER, J.R.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. **Br J Dermatol**, v.151, n.6, p.1234-1244, 2004.

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J Am Acad Dermatol**, v.58, p.139-148. 2008.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.195, p.298-308, 2004.

MATTS, P.J. Solar Ultraviolet Radiation: Definitions and Terminology. **Dermatol Clin** v.24, p.1-8, 2006.

MEERAN, S.M.; PUNATHIL, T.; KATIYAR, S.K. Interleukin-12-deficiency exacerbates inflammatory responses in UV irradiated skin and skin tumors. **J Invest Dermatol**, v.128, p.2716–2727, 2008.

MENDROK-EDINGER, C.; AMITH, K.; JANSSEN, A.; VOLLHART, J. The Quest for Avobenzone Stabilizers and Sunscreen Photostability DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland. **Cosmet Toil,** v.124, n.2, 2009.

MERCKEL, G.; ROHWER, H. UV Protection – Care of Skin and Ingredients. **SÖFW Journal**, v.127, 2001.

MILLER SA, HAMILTON SL, WESTER UG, et al. An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. **Photochem Photobiol**, v.68, p.63–70. 1998

MOROHOSHI, K.; YAMAMOTO, H.; KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; KODA, T.; MORITA, M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. **Toxicol In Vitro,** v.19, n.4, p.457– 469, 2005.

MTURI; MARTINCIGH, Photostability of the sunscreening agent 4-tert-butyl-4´-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **J Photochem Photob A**: **Chemistry,** v.200, p.410–420, 2008.

MY DATA NASA. Disponível em https://mynasadata.larc.nasa.gov/ElectroMag.html. Acesso em 01 de julho de 2012.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; JOSHUA, L.; FOX, J.L. **Internat J Dermatol,** v.49, p.978–986, 2010.

NASH, J.F. Human Safety and Efficacy of Ultraviolet Filters and Sunscreen Products. **Dermatol Clin**, v.24, p.35–51, 2006.

OECD, 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004) <http://www.oecd.org/>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (World Health Organization – WHO), Disponível em: http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html. Acesso em julho de 2012.

OTTOLENGHI, M. The photochemistry of rhodopsin. **Advances in Photochemistry**, v. 12, p. 97–200, 1980.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.A. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. **Photochem Photobiol**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.

PASTILA, R.; LESZCZYNSKI, D. Ultraviolet-A radiation induces changes in cyclin G gene expression in mouse melanoma B16-F1 cells. **Cancer Cell Int,** v.7, n.7. 2007.

PATHAK, M.A.; CARRARO, C. Reactive oxygen species in cutaneous photosensitivity reactions in porphyrias, PUVA photochemotherapy, and melanin pigmentation. In: HAYAISHI, O.; IMAMURA, S.; MYACHI, Y.. **The Biological Role of Reactive Oxygen Species in the Skin**. Tokyo University Press, Tokyo, p.75-84, 1988.

PIERGIACOMI, V.A.; PALACIOS, A.; CATALA, A. Comparative studies on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria obtained from different rat tissues: effect of retinylpalmitate. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.64, n.2, p.75-80, 2001.

PRESTON, D.S.; STERN, R.S. Nonmelanoma cancers of the skin. **N Engl J Med,** v.327, p.1649–1662, 1992.

REBUT, D. The sunscreen industry in Europe: past, present and future. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A. **Sunscreens, Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York: Marcel Dekker, p.161–171, 1990.

RIEGER, M.M. Photostability of cosmetic ingredients on the skin. **Cosmet Toil**, v.112, p.65-72, 1997.

ROELANDTS, R. Advances in sunscreen technology: choosing the sunscreen to suit. **Curr Opin Dermatol**, v.2, p.173–177, 1995.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. **Analysis of Cosmetic Products,** 1st ed. Elsevier Science, 2007. ISBN: 9780444522603

SCHAUDER, S.; IPPEN, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15-year experience and of the literature. **Contact Dermatitis**, v.37, n.5, p.221–232, 1997.

SCHROEDER, P.; HAENDELER, J.; KRUTMANN J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. **Exp Gerontol,** v.43, p.629–632, 2008.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoylmethane UVA filters. Part 1. **J Photochem Photobiol B, Biol**, v.28, p.229–234, 1995.

SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. **Chemical Reviews**, v.71, p.1685-1757, 2003.

SEIDLOVA-WUTTKE, D.; CHRISTOFFEL, J.; RIMOLDI, G.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)—2 filters of UV light on several uterine, vaginal, and bone parameters. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.214, n.1, p.1-7, 2006.

SHAATH, N.A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A. **Sunscreens, Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York, Marcel Dekker, p.3–35, 1990.

SHAATH, N.A. **The Encyclopedia of Ultraviolet Filters**, Carol Stream, IL USA: Allured p.19, 2007.

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

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; BRAND, M.; DÖRING, B.; HOLZHÜTTER, H.G.; KALWEIT, S.; KLECAK, G.; L'EPATTENIER, H.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W.W.; MAURER, T.; MOLDENHAUER, F.; MOORE, L.; PAPE, W.J.W.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J.; DE SILVA, O.; STEILING, W.; WILLSHAW, A. EC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with the Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. **Toxicology in Vitro**, v.8, p.793–796, 1994.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W.J.W.; PECHOVITCH, G.; DE SILVA, O.; HOLZHÜTTER, H.G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W.W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J. M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity phototoxicity test. **Toxicology in Vitro**, v.12, p.305–327, 1998.

SUZUKI, T.; KITAMURA S.; KHOTA, R.; SUGIHARA, K.; FUJIMOTO, N.; OHTA, S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.203, n.1, p.9–17, 2005.

TARRAS-WAHLBERG, N.; STENHAGEN, G.; LARKO, O.; ROSE´N, A.; WENNBERG, A.M.; WENNERSTRO, O. Changes in Ultraviolet Absorption of Sunscreens After Ultraviolet Irradiation. **J Invest Dermatol**, v.113, p.547-553, 1999.

THOMAS, L.; LIM, H.W. Sunscreens. **J Drugs Dermatol,** v.2, p.174–177, 2003.

THOMSON, A. J.; Fluorescence spectra of some retinyl polyenes**. J. chem. Phys.** v.51, p. 4106-4116, 1969.

TOLLESON, W.H.; CHERNG, S.H.; XIA, Q.; BOUDREAU, M.; YIN, J.J.; WAMER, W.G.; HOWARD, P.C.; YU, H.; FU, P.P. Photodecomposition and phototoxicity of natural retinoids. **Int J Environ Res Public Health**., v.2, n.1, p.147-155, 2005.

TUCHINDA, C.; LIM, H.W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatol Clin** v.24, p.105–117, 2006.

URBACH. F. The historical aspects of sunscreens. **J Photochem Photobiol B, Biol**; v.64, n.2-3, p.99–104, 2001.

WALTERS, K.A.; BRAIN, K.R.; HOWES, D.; JAMES, V.J.; KRAUS, A.L.; TEETSEL, N.M.; TOULON, M.; WATKINSON, A.C.; GETTINGS, S.D. Percutaneous penetration of octyl salicylate from representative sunscreen formulations through human skin in vitro. **Food Chem Toxicol,** v.35, n.12, p.1219–1225, 1997.

WESTERDAHL, J.; OLSSON, H.; INGVAR, C. At what age do sunburn episodes play a crucial role for the development of malignant melanoma. **Eur J Cancer,** v.30A, p.1647–1654, 1994.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POOR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, L.A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHULLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **J Photochem Photobiol B**, **Biol**, v.63, p.41–51, 2001.

WOLF, G. A History of Vitamin A and Retinoids. **FASEB J**, v.10, p.1102-1107, 1996.