

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de  
fotoprotetores contendo associações de filtros solares, *trans*-  
resveratrol e beta-caroteno**

**Juliana Vescovi de Freitas**

**Ribeirão Preto**  
**2013**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de fotoprotetores contendo associações de filtros solares, *trans-resveratrol* e beta-caroteno**

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

**Orientado (a):** Juliana Vescovi de Freitas

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

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 22/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

**Ribeirão Preto**  
**2013**

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.

Freitas, Juliana Vescovi

Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de fotoprotetores contendo associações de filtros solares, *trans-resveratrol* e beta-caroteno. Ribeirão Preto, 2013.

162p.: il.; 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. *Trans-resveratrol*.
3. Beta-caroteno.
4. Fotoestabilidade.
5. Penetração cutânea.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Juliana Vescovi de Freitas

Título do trabalho: Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de fotoprotetores contendo associações de filtros solares, *trans-resveratrol* e beta-caroteno

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**, pelo dom da vida, pela família, pelo fortalecimento espiritual, paz e tranquilidade nos momentos atribulados, pelas bênçãos e por iluminar sempre os meus caminhos.

Aos meus queridos pais, **Leoncio** e **Nilza**, pelo incansável apoio e incentivo para realização dos meus sonhos, pelo imensurável amor, carinho, dedicação e compreensão, e pelos exemplos de vida, cristianismo e profissionalismo.

À minha irmã **Caroline**, pelo apoio e incentivo constantes, e pelo carinho, amizade e amor verdadeiros.

A todos os meus **familiares** e **amigos** pelo apoio, incentivo, carinho e companheirismo.

Ao meu namorado, **Fábio**, pelo amor, apoio, paciência, compreensão e companheirismo em todos os momentos. Também à sua família por me acolherem e pelo apoio.

A **todas as pessoas**, que foram fundamentais nesta caminhada, pois apenas meu esforço e dedicação não seriam suficientes para realização desse sonho.

### ***Agradecimento especial***

*À minha orientadora, Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, pelos ensinamentos, pela dedicação, orientação e incentivo constantes, pelo exemplo de determinação e profissionalismo, e por sua amizade e apoio em todas as horas.*

# *Agradecimentos*

Às amigas do laboratório Tecnologia de Cosméticos (Tecnoprot), **Carolina**, pela orientação em várias atividades, **Larissa, María Tereza, Bianca, Camila e Natália**, pelo apoio, amizade e colaboração.

Às amigas do NEATEC, **Carla, Daiane, Taís, e Jirrah** pela amizade e incentivo.

Aos pós-graduandos **Joel e Silas**, pelas orientações e solicitude em vários momentos.

À professora Dra. **Renata Fonseca Vianna Lopez**, pela concessão do uso de materiais e equipamentos para realização dos experimentos de fotoestabilidade e penetração cutânea.

À professora Dra. **Maria Vitória L. B. Bentley**, pela concessão do uso de materiais e equipamentos para realização dos experimentos de penetração cutânea.

Ao professor Dr. **Roberto Santana da Silva**, pela concessão do espectrofotômetro para realização dos experimentos de fotoestabilidade.

A todos os **Professores** que, em algum momento, gentilmente cederam algum material ou equipamento para a realização deste trabalho, e que contribuíram com alguma sugestão para a pesquisa.

Aos professores Dra. **Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos**, Dra. **Marilisa Guimarães Lara** e Dr. **Marcos Antônio Corrêa**, pelas correções e sugestões feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

Aos técnicos **Patrícia**, pela ajuda e solicitude, **Karina, Mariana, Tomas, Juliana, Júnior**, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À **Fabiola Garcia**, pelas orientações, solicitude durante os experimentos e importantes contribuições para o trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana dos Santos Florêncio**, por toda assistência prestada durante a realização desse trabalho.

A todos os **Professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que contribuíram para minha formação.

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

A **todos** que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo apoio financeiro.



*“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu tamanho  
original.”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

FREITAS, J. V. **Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de fotoprotetores contendo associação de filtros solares, *trans*-resveratrol e beta-caroteno.** 2013. 162f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Em virtude da necessidade de proteger a pele contra as espécies reativas de oxigênio, geradas excessivamente após exposição aos raios UV, substâncias antioxidantes têm sido adicionadas aos fotoprotetores. Entretanto associações fotoestáveis podem levar à formação de intermediários reativos, que são prejudiciais ao organismo, e à redução da atividade dos filtros solares e antioxidantes. Além disso, as características de penetração dos filtros solares e antioxidantes influenciam diretamente a segurança e a eficácia dos fotoprotetores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a fotoestabilidade e a penetração cutânea de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares acrescidas ou não de *trans*-resveratrol e beta-caroteno, por meio do uso de CLAE e espectrofotometria e de células de Franz, respectivamente. Para tal, foram desenvolvidas formulações contendo diferentes associações de filtros solares (associações 1, 2 e 3), que apresentavam em comum avobenzona, metoxicinamato de etil-hexila e octocrileno, acrescidas de *trans*-resveratrol e beta-caroteno, isoladamente ou em combinação. Para avaliar a fotoestabilidade, amostras das formulações foram aplicadas em lâminas de vidro e expostas à radiação UVA e, a seguir, submetidas a análises por CLAE, para determinar o teor dos filtros solares e antioxidantes em estudo, e por espectrofotometria, para determinação da razão UVA/UVB. Para avaliar a penetração cutânea, as formulações contendo a associação de filtros solares mais fotoestável foram aplicadas sobre a pele de orelha de porco, e foi realizada a quantificação das substâncias em estudo, presentes no estrato córneo (EC), na epiderme/derme (E+D) e na solução receptora, por CLAE. O estudo de fotoestabilidade por CLAE dos filtros solares e antioxidantes presentes nas formulações avaliadas mostrou que, apesar de terem apresentado boa fotoestabilidade, todas as substâncias foram fotoestáveis, com exceção do bemotrizinol, octiltriazona e octocrileno. Além disso, foi observado que o uso dos antioxidantes em associação foi melhor do que utilizá-los separadamente em fotoprotetores. As análises espectrofotométricas mostraram que, após irradiação, houve redução significativa da razão UVA/UVB de todas as formulações e que as formulações contendo bemotrizinol (associação 2) e octiltriazona (associação 3) apresentaram, respectivamente, aumento e redução significativos da razão UVA/UVB, com relação às formulações que não apresentavam esses filtros. No estudo de penetração cutânea, foi observado que, após aplicação das formulações contendo bemotrizinol (associação 2), os filtros solares e antioxidantes avaliados penetraram a pele, mas não permearam até a solução receptora, ou seja, ficaram retidos no EC, majoritariamente, e na E+D. Além disso, foi observada redução significativa da retenção no EC dos filtros solares e antioxidantes avaliados na presença do beta-caroteno. Os resultados desse estudo contribuíram para mostrar os benefícios da utilização de uma combinação de antioxidantes em fotoprotetores, uma vez que a combinação do *trans*-resveratrol e do beta-caroteno, resultou em melhor fotoestabilidade das formulações e também apresentou vantagens no estudo de penetração cutânea, pois reduziu a penetração dos filtros solares.

Palavras-chave: Filtros solares. *Trans*-resveratrol. Beta-caroteno. Fotoestabilidade. Penetração cutânea.

## ABSTRACT

FREITAS, J. V. **Evaluation of photostability and cutaneous penetration of sunscreens containing combinations of UV-filters, *trans*-resveratrol and beta-carotene.** 2013. 162f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Due to the need to protect the skin against reactive oxygen species, which are excessively generated after exposure to UV rays, antioxidants compounds have been added to sunscreens. However, photounstable combinations can lead to generation of reactive intermediates, that are harmful to the body, and decrease the photoprotective activity of UV-filters and antioxidants. Furthermore, the penetration characteristics of UV-filters and antioxidants influence directly sunscreens safety and efficacy. Thus, the aim of this study was to develop and to evaluate the photostability and cutaneous penetration of sunscreen formulations containing different combinations of UV-filters supplemented or not with *trans*-resveratrol and beta-carotene, by using HPLC and spectrophotometry and Franz cells, respectively. For this, formulations containing different UV-filters combinations (combinations 1, 2 and 3), which had in common avobenzene, ethyl-hexyl methoxycinnamate and octocrylene, supplemented with *trans*-resveratrol and beta-carotene, alone or in combination, were prepared. For photostability evaluation, samples of the formulations were spread onto glass plates, exposed to UVA radiation and then analyzed by HPLC to determine the concentration of UV-filters and antioxidants under study, and by spectrophotometry to determine the UVA/UVB ratio. To assess cutaneous penetration, formulations containing the most photostable combination of UV-filters were applied on pig ear skin, and the quantification of substances under study present into stratum corneum (SC), viable epidermis plus dermis (E+D) and receptor fluid was performed by HPLC. HPLC photostability study, which analyzed the UV-filters and antioxidants present in formulations, showed that all substances, despite having good photostability, were photounstable, except bemotrizinole, octyltriazone and octocrylene. Furthermore, it was observed that the use of antioxidants in combination was better than using them separately in sunscreens. The spectrophotometric analysis showed that after irradiation, all formulations had a significant decrease of UVA/UVB ratio, and that formulations containing bemotrizinole (combination 2) and octyltriazone (combination 3) presented, respectively, significant increase and decrease of the UVA/UVB ratio, in comparison with formulations that did not contained these UV-filters. In the cutaneous penetration study it was observed that after application of formulations containing bemotrizinole (combination 2), the UV-filters and antioxidants under study penetrated the skin, but did not reach the receptor fluid, which means that they were retained in SC, predominantly, and in E+D. Furthermore, a significant decrease on SC retention of UV-filters and antioxidants under study in the presence of beta-carotene was observed. The results of this study contributed to demonstrate the benefits of using a combination of antioxidants in sunscreens, since the combination of *trans*-resveratrol with beta-carotene, resulted in improved photostability of the formulations and also showed advantages in the skin penetration study, because it reduced UV-filters penetration.

Keywords: UV-filters. *Trans*-resveratrol. Beta-carotene. Photostability. Cutaneous penetration.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação das camadas da pele. 8
- Figura 2** – Representação da deslocalização de elétrons do PABA. 13
- Figura 3** – Representação da deslocalização de elétrons dos salicilatos. 14
- Figura 4** – Representação da deslocalização de elétrons dos cinamatos. 14
- Figura 5** – Estrutura do o *E*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato e *Z*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato deslocalização de elétrons dos cinamatos. 15
- Figura 6** – Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona. 16
- Figura 7** – Estrutura molecular do octocrileno. 17
- Figura 8** – Estrutura molecular da octiltriazona (**A**) e do bemotrizinol (**B**). 17
- Figura 9** – Estrutura molecular do *trans*- e *cis*-resveratrol. 19
- Figura 10** – Estrutura molecular do beta-caroteno. 21
- Figura 11** – Vias de penetração cutânea: folículo piloso (**A**), estrato córneo transcelular e intercelular (**B**), e glândula sudorípara (**C**). 28
- Figura 12** – Representação esquemática da célula de difusão vertical de Franz. 46
- Figura 13** – Formulações contendo as bases autoemulsificantes A, B, C e D acrescidas de *trans*-resveratrol e beta-caroteno após 15 dias de armazenamento a 45°C. **A**: formulações contendo a associação 2 de filtros solares. **B**: formulações contendo a associação 3 de filtros solares 54
- Figura 14** – Perfil cromatográfico dos padrões das substâncias em estudo. (**A**): *Trans*-resveratrol (RES). (**B**): Octocrileno (OCT). (**C**): metoxicinamato de etil-hexila (MTX). (**D**): Avobenzona (AVO). (**E**): Octiltriazona (OTZ). (**F**): Beta-caroteno (BTC). (**G**): Bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo: 0.8 mL.min<sup>-1</sup>; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 (filtros solares e trans-resveratrol) e 454nm (beta-caroteno). 56

- Figura 15** – Perfil cromatográfico da extração do veículo (formulação sem nenhum filtros solar ou substância em estudo) (A), do branco de reagente, ou seja, tetrahydrofurano:isopropanol (30:70) (B), e dos filtros solares e antioxidantes em solução de tetrahydrofurano:isopropanol (30:70) (C). Picos: *Trans*-resveratrol (RES), Octocrileno (OCT), Metoxicinamato de etil-hexila (MTX), Avobenzona (AVO), Octiltiazona(OTZ), Beta-caroteno (BTC) e Bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 14. 57
- Figura 16** – Curvas analíticas do *trans*-resveratrol (A) e octocrileno (B). 59
- Figura 17** – Curvas analíticas do metoxicinamato de etil-hexila (A) e da avobenzona (B). 60
- Figura 18** – Curvas analíticas da octiltiazona (A) e do beta-caroteno (B). 61
- Figura 19** – Curva analítica do bemotrizinol. 62
- Figura 20** – Cromatogramas das formulações F1F irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX) e avobenzona (AVO). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo: 0,8 mL.min<sup>-1</sup>; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 nm. 64
- Figura 21** – Cromatogramas das formulações F1R irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX) e avobenzona (AVO). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20. 65
- Figura 22** – Cromatogramas das formulações F1B irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20. 66
- Figura 23** – Cromatogramas das formulações F1RB irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20. 67
- Figura 24** – Cromatogramas das formulações F2F irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20. 68

- Figura 25** – Cromatogramas das formulações F2R irradiada (A) e não irradiada (B). 69  
Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 26** – Cromatogramas das formulações F2B irradiada (A) e não irradiada (B). 70  
Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), beta-caroteno (BTC) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 27** – Cromatogramas das formulações F2RB irradiada (A) e não irradiada (B). 71  
Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), beta-caroteno (BTC) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 28** – Cromatogramas das formulações F3F irradiada (A) e não irradiada (B). 72  
Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e oclitriazona (OTZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 29** – Cromatogramas das formulações F3R irradiada (A) e não irradiada (B). 73  
Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), oclitriazona (OTZ) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 30** – Cromatogramas das formulações F3B irradiada (A) e não irradiada (B). 74  
Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), oclitriazona (OTZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 31** – Cromatogramas das formulações F3RB irradiada (A) e não irradiada (B). 75  
Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), oclitriazona (OTZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.
- Figura 32** – Porcentagem remanescente do *trans*-resveratrol (A) e beta-caroteno (B) 86  
nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 ( mediana e intervalo de confiança 95%).

- Figura 33** – Porcentagem remanescente do metoxicinamato de etil-hexila (**A**) e avobezona (**B**) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 ( mediana e intervalo de confiança 95%). 87
- Figura 34** – Porcentagem remanescente do bemotrizinol (**A**), octiltriazona (**B**) e octocrileno (**C**) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 ( mediana e intervalo de confiança 95%). 88
- Figura 35** – Espectro de varredura no UV (290-400nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo a associação 1, 2 e 3 de filtros solares. (**A**): Formulações FF, ou seja, contendo apenas filtros solares. (**B**): Formulações FR, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol. 90
- Figura 36** – Espectro de varredura no UV (290-400nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo a associação 1, 2 e 3 de filtros solares. (**A**): Formulações FB, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de beta-caroteno. (**B**): Formulações FRB, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno. 91
- Figura 37** – Razão UVA/UVB de todas as formulações em estudo, irradiadas e não irradiadas, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 (mediana e intervalo de confiança 95%). 95
- Figura 38** – Porcentagem de solubilidade dos ativos nas diferentes soluções receptoras avaliadas (7 mL), com agitação de 300 rpm, durante 4 horas e meia. S1: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M); S2: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 10% de etanol; S3: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 30% de etanol; S4: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 4% de polissorbato 80; S5: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 10% de propilenoglicol; S6: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 4% de BSA; e S7: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 2% de Olet-3. 96
- Figura 39** – Perfil cromatográfico da solução receptora ressuspendida em tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) (**A**) e da solução extratora contendo fragmentos de E+D (**B**). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo: 0,8 mL.min<sup>-1</sup>; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 e 454nm. 97

- Figura 40** – Perfil cromatográfico da solução extratora contendo fita adesiva (A) e da solução extratora contendo fita adesiva com o EC (B). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 39. 98
- Figura 41** – Curvas analíticas do *trans*-resveratrol (A) e octocrileno (B). 99
- Figura 42** – Curvas analíticas do metoxicinamato de etil-hexila (A) e avobenzona (B). 100
- Figura 43** – Curvas analíticas do beta-caroteno (A) e bemotrizinol (B). 101
- Figura 44** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2F por 12 horas. Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo: 0,8 mL.min<sup>-1</sup>; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 nm. 111
- Figura 45** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2R por 12 horas. Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44. 112
- Figura 46** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2B por 12 horas. Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), bemotrizinol (BMZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44. 113
- Figura 47** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2RB por 12 horas. Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), bemotrizinol (BMZ) e beta-caroteno. Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44. 114
- Figura 48** – Concentração de *trans*-resveratrol (A) e de beta-caroteno (B) (µg/cm<sup>2</sup>) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA, n=6 (média e intervalo de confiança 95%). 122



- Figura 49** – Concentração de metoxicinamato de etil-hexila (**A**) e de avobenzona (**B**) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA, n=6 ( média e intervalo de confiança 95%). 123
- Figura 50** – Concentração de octocrileno (**A**) e de bemotrizinol (**B**) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA, n=6 ( média e intervalo de confiança 95%). 124
- Figura 51** – Distribuição das substâncias em estudo na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB) (% com relação ao total aplicado, ou seja, 250mg de formulação). (**A**): *Trans*-resveratrol. (**B**): Beta-caroteno. (**C**): Metoxicinamato de etil-hexila. (**D**): Avobenzona. (**E**): Octocrileno. (**F**): Bemotrizinol. 125

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Classificação de acordo com o <i>Boot's Star Rating System</i> da proteção UVA oferecida pelo fotoprotetor com base na razão UVA/UVB.	27
<b>Tabela 2</b> –	Associações de filtros solares.	37
<b>Tabela 3</b> –	Composição das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade.	39
<b>Tabela 4</b> –	Composição das formulações submetidas ao estudo de fotoestabilidade.	40
<b>Tabela 5</b> –	Composição das soluções receptoras (S) utilizadas nos ensaios preliminares de solubilidade.	47
<b>Tabela 6</b> –	Valores de pH das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade.	53
<b>Tabela 7</b> –	Precisão e exatidão intra e inter-ensaio das formulações F2RB e F3RB. RES: <i>Trans</i> -resveratrol; OCT: Octocrileno; MTX: Metoxicinamato de etil-hexila; AVO: Avobenzona; OTZ: Octiltriazone; BTC: Beta-caroteno; BMZ: Bemotrizinol.	62
<b>Tabela 8</b> –	Concentrações remanescentes do <i>trans</i> -resveratrol nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	76
<b>Tabela 9</b> –	Concentrações remanescentes do beta-caroteno nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	77
<b>Tabela 10</b> –	Concentrações remanescentes do metoxicinamato de etil-hexila nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	78
<b>Tabela 11</b> –	Concentrações remanescentes do avobenzona nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	80
<b>Tabela 12</b> –	Concentrações remanescentes do bemotrizinol nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	82
<b>Tabela 13</b> –	Concentrações remanescentes da octiltriazone nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	82
<b>Tabela 14</b> –	Concentrações remanescentes do octocrileno nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m <sup>2</sup> de radiação UVA.	83

<b>Tabela 15</b> – Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa da UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação.	92
<b>Tabela 16</b> – Valores obtidos para os limites inferiores de quantificação (LIQ) e intervalos de dosagem das substâncias analisadas.	102
<b>Tabela 17</b> – Dados de limite inferior de quantificação (LIQ) no fluido receptor, na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC) equivalente a 5 vezes resposta do branco.	102
<b>Tabela 18</b> – Dados de exatidão e precisão do <i>trans</i> -resveratrol.	103
<b>Tabela 19</b> – Dados de exatidão e precisão do octocrileno.	104
<b>Tabela 20</b> – Dados de exatidão e precisão do metoxicinamato de etil-hexila.	105
<b>Tabela 21</b> – Dados de exatidão e precisão da avobenzona.	106
<b>Tabela 22</b> – Dados de exatidão e precisão do beta-caroteno.	107
<b>Tabela 23</b> – Dados de exatidão e precisão do bemotrizinol.	108
<b>Tabela 24</b> – Recuperação dos filtros solares e antioxidantes em estudo em amostras de pele.	109
<b>Tabela 25</b> – Concentração das substâncias em estudo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) presentes na solução receptora (n=6, ND = não detectável)	109
<b>Tabela 26</b> – Concentração de <i>trans</i> -resveratrol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.	115
<b>Tabela 27</b> – Concentração de beta-caroteno ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.	115
<b>Tabela 28</b> – Concentração de metoxicinamato de etil-hexila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.	116
<b>Tabela 29</b> – Concentração de avobenzona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.	117
<b>Tabela 30</b> – Concentração de octocrileno ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.	118

**Tabela 31** – Concentração de bemotrizinol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas. 119

**Tabela 32** – Porcentagem dos filtros solares e antioxidantes encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas. 120

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C	Graus Célcus
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetros
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVO	Avobenzona
BMZ	Bemotrizinol
BSA	Soroalbumina bovina
BTC	Beta-caroteno
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
COLIPA	<i>European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i>
CV	Coefficiente de variação
DME	Dose mínima eritematosa
DMP	Dose mínima pigmentaria
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E+D	Epiderme e derme
EC	Estrato córneo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FP-UVA	Fator de proteção UVA
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INN	<i>International Nonproprietary Names</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KJ	Quilojoules
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
M	Metros
mL	Mililitros

Mm	Milímetros
MTX	Metoxicinamato de etil-hexila
ND	Não detectável
nm	Nanômetros
OCTO	Octocrileno
OTZ	Octiltriazona
p/p	Peso/peso
PABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzóico
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Coefficiente de correlação
RES	<i>Trans</i> -resveratrol
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VIS	Visível
W	Watts
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\text{TM}}$	<i>Trademark</i>
$^{\text{®}}$	Marca registrada
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade molar
$E$	Isômero <i>trans</i>
$Z$	Isômero <i>cis</i>
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{O}_2$	Oxigênio molecular
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxil
$\text{O}_2\bullet$	Radical superóxido
$\text{ROO}\bullet$	Radical peroxil
$\text{RO}\bullet$	Radical alcoxil

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de símbolos.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
2.1. A pele e a radiação UV.....	8
2.2. Fotoprotetores.....	11
2.2.1. Filtros solares.....	12
2.2.2. Antioxidantes.....	18
2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores.....	22
2.3.1. Fotoestabilidade.....	22
2.3.2. Avaliação da eficácia de fotoprotetores.....	25
2.3.3. Penetração e permeação cutâneas.....	27
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Materiais.....	34
4.1.1. Matérias-primas e reagentes.....	34
4.1.2. Equipamentos e acessórios.....	36
4.1.3. Pele.....	37
4.2. Métodos.....	37
4.2.1. Elaboração das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade.....	37
4.2.2. Testes preliminares de estabilidade.....	40
4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares, dos antioxidantes e das formulações.....	41
4.2.3.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo.....	41
4.2.3.2. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	42
4.2.3.2.1. Seletividade.....	42
4.2.3.2.2. Linearidade.....	43
4.2.3.2.3. Precisão e exatidão.....	44
4.2.3.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV.....	45
4.2.3.4. Análise estatística.....	45



4.2.4. Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i> dos filtros solares e antioxidantes...	45
4.2.4.1. Preparação da pele de orelha de porco.....	46
4.2.4.2. Determinação da solução receptora.....	46
4.2.4.3. Aplicação das formulações e coleta da solução receptora.....	47
4.2.4.4. Avaliação da retenção dos filtros solares e antioxidantes no estrato córneo por <i>tape stripping</i> .....	48
4.2.4.5. Avaliação da retenção dos filtros solares e antioxidantes na epiderme viável e derme.....	49
4.2.4.6. Determinação dos filtros solares e antioxidantes por CLAE.....	49
4.2.4.6.1. Seletividade: Pesquisa de interferentes.....	49
4.2.4.6.2. Linearidade.....	50
4.2.4.6.3. Limite inferior de quantificação.....	50
4.2.4.6.4. Recuperação dos filtros solares e antioxidantes.....	51
4.2.4.7. Análise estatística.....	51
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1. Testes preliminares de estabilidade.....	53
5.2. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares, dos antioxidantes e das formulações.....	54
5.2.1. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por CLAE...	54
5.2.1.1. Padronização do método de CLAE.....	54
5.2.1.1.1. Seletividade.....	55
5.2.1.1.2. Linearidade.....	58
5.2.1.1.3. Precisão e exatidão.....	62
5.2.1.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e antioxidantes por CLAE.....	63
5.2.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV.....	89
5.3. Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i> dos filtros solares e antioxidantes.....	95
5.3.1. Determinação da solução receptora.....	95
5.3.2. Padronização do método de CLAE para o estudo de penetração cutânea...	96
5.3.2.1. Seletividade: Pesquisa de interferentes.....	96
5.3.2.2. Linearidade.....	98
5.3.2.3. Limite inferior de quantificação.....	102
5.3.2.4. Análise da recuperação.....	109
5.3.3. Penetração cutânea.....	109
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>126</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>140</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>142</b>

# ***1. Introdução***

A radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol é conhecida por provocar inúmeros danos ao tecido epitelial, sendo o mais grave deles o câncer de pele, que, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), é responsável por milhares de mortes ao ano. Além disso, a exposição da pele aos raios UV sem nenhuma proteção favorece a ocorrência de estresse oxidativo, danos ao DNA, envelhecimento precoce da pele, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), e múltiplos efeitos sobre o sistema imune, que juntos tem importante papel na geração e manutenção de neoplasmas induzidos por raios UV (NICHOLS; KATIYAR, 2010), além de diminuir a hidratação e elasticidade da pele (LAVKER et al., 1995a). O espectro responsável por causar esses danos compreende os comprimentos de onda que vão de 290 a 400 nm, e inclui as radiação UVB e UVA (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

A principal forma, e também a mais amplamente utilizada, para se proteger contra os danos causados pelos raios UV, consiste no uso de formulações fotoprotetoras. De acordo com Moyal e Fourtanier (2008), o uso fotoprotetores que tenham elevada proteção contra os raios UVA e UVB, reduz a fotoimunossupressão induzida pela radiação UV. Além disso, segundo Wang, Osterwalder e Jung (2011), uma proteção de amplo espectro, especialmente no comprimento de onda da UVA, é importante para prevenir a formação de radicais livres.

Os filtros solares utilizados atualmente minimizam ou evitam os danos causados pelo UV ao absorver ou refletir a radiação, impedindo-a de interagir com as moléculas do organismo e assim de desencadear seus efeitos sobre a pele. Os filtros orgânicos geralmente atuam pelo primeiro mecanismo, enquanto os inorgânicos atuam pelo último. Existem também no mercado, filtros orgânicos que além de absorver, refletem a radiação UV (GRANGER; BROWN, 2001).

O metoxicinamato de etil-hexila confere proteção UVB, com absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em 311 nm, e é o principal representante dos cinamatos e também o mais utilizado mundialmente (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008). Esse composto apresenta certa instabilidade, visto que estudos demonstram que o isômero *E* dessa molécula, que possui um alto coeficiente de absorvidade molar, pode ser convertido no isômero *Z* na presença da luz solar, o qual possui um coeficiente de absorvidade molar bem inferior, o que leva à redução da absorção UVB (PATTANAARGSON; LIMPHONG, 2001; PATTANAARGSON et al., 2004; SHAATH, 2010).

A octiltriazona apresenta alta absorção na faixa da UVB, e é considerada fotoestável (SHAATH, 2010). Além disso, Degwert, Pape e Hoppe (1994) consideram essa molécula um forte imunoprotetor, uma vez que ao realizar ensaios *in vitro*, concluíram que a

imunossupressão induzida pela UVB foi completamente prevenida ao utilizar fotoprotetores contendo octiltriazona.

A avobenzona, apesar de ser muito instável, é um dos filtros UVA mais utilizados em formulações fotoprotetoras. Esse filtro possui grande absorção na faixa de 340 a 350 nm, no entanto, quando exposto ao UV, apresenta redução dessa absorção devido a reações de tautomerização, fragmentação e formação de fotoprodutos, o que resulta na perda do seu efeito fotoprotetor (DAMIANI et al., 2006; PARIS et al., 2009; SCHWACK; RUDOLPH, 1995).

O octocrileno, além de atuar como filtro solar UVB, também atua como fotoestabilizador. Essa molécula se mostrou capaz de aumentar a estabilidade do metoxicinamato de etil-hexila na presença da avobenzona (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). Adicionalmente, a fotoestabilidade da avobenzona foi aumentada quando a mesma foi incorporada em micropartículas lipídicas contendo octocrileno (SCALIA; MEZZENA, 2009).

O bemotrizinol confere proteção em um amplo espectro da radiação UV, de 290 a 390 nm, e também pode atuar como fotoestabilizador (SHAATH, 2010). Esse filtro solar apresenta um duplo mecanismo de ação, sendo capaz de absorver e refletir os fótons da radiação UV. Além disso, já foi descrito que o bemotrizinol confere fotoestabilidade a protetores solares contendo metoxicinamato de etil-hexila e avobenzona (CHATELAIN; GABARD, 2001).

Atualmente se sabe que a formação de EROS pode desencadear processos celulares que culminam em danos ao DNA, favorecendo, conseqüentemente, o fotoenvelhecimento, formação de rugas e até mesmo o surgimento de neoplasias (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006). Sabe-se também que o sistema enzimático do organismo não é capaz de neutralizar a grande quantidade de radicais livres que é formada pelas reações desencadeadas pela radiação UV (BLACK et al., 1983). Além disso, a absorção de radiação UV pelos filtros solares também pode levar à formação de EROS (CHAUDHURI et al., 2006; LEWICKA et al., 2013; LHIAUBET-VALLET et al., 2010). Assim, observa-se uma tendência em associar aos filtros solares, substâncias com atividade antioxidante com o objetivo de melhorar o potencial das formulações em prevenir ou minimizar os danos induzidos pela radiação UV e também de proteger a pele contra as EROS que podem ser geradas pelos filtros solares.

Nesse contexto, o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno representam alternativas interessantes para elaboração de novas formulações fotoprotetoras, tendo em vista seu elevado potencial antioxidante (BAYERL, 2008; SHANKAR; SINGH; SRIVASTAVA, 2007).

O resveratrol é um polifenol encontrado na forma *cis*- e *trans*-, sendo a última a mais estável e biologicamente ativa (BAXTER, 2007). Esse estilbeno apresenta ótima atividade antioxidante, sendo que, em estudo realizado por Gülçin (2010), mostrou-se efetivo na neutralização de radicais livres e do peróxido de hidrogênio e em quelar metais, quando comparado a compostos antioxidantes padrões, tais como BHA, BHT e  $\alpha$ -tocoferol. Em tal estudo, o *trans*-resveratrol foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica do ácido linoléico em 89,1% e de quelar 86,3% dos íons de ferro.

O *trans*-resveratrol também tem mostrado ação fotoprotetora contra UVB (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; AZIZ; AFAQ; AHMAD, 2005). No estudo de Afaq, Adhami e Ahmad (2003) esse composto proporcionou proteção contra os danos causados pela exposição ao UVB, ainda que esses efeitos possam ter sido mediados por suas fortes propriedades antioxidantes. Além disso, outros estudos têm demonstrado a atividade inibitória do resveratrol em vários tipos de câncer, incluindo o de pele (PEZZUTO, 2008).

O beta-caroteno apresenta ação antioxidante, sendo capaz de seqüestrar radicais livres e reduzir a peroxidação lipídica na pele humana, o que pode reduzir a propensão ao câncer de pele (BAR-NATAN et al., 1996). Alguns estudos relataram a proteção oferecida pelo beta-caroteno contra a radiação UV e também infravermelha (BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998). Segundo Darvin et al. (2011), a aplicação tópica de uma formulação contendo beta-caroteno conferiu proteção à pele humana contra a ação de radicais livres, formados em consequência da exposição à radiação infravermelha. Outros estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação tópica de beta-caroteno conferiu proteção contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA (EVELSON et al., 1997; YASUI; SAKURAI, 2000).

Atualmente existem controvérsias sobre os reais efeitos fotoprotetores do beta-caroteno. Enquanto muitos autores encontraram efeito quimiopreventivo e ação antioxidante, o que torna seu uso interessante em fotoprotetores, outros encontraram agravamento dos efeitos de alguns tipos de câncer e ação pró-oxidante (BIESALSKI; OBERMUELLER-JEVIC, 2001). Entretanto, estudos mostram que a associação do beta-caroteno a outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E (BÖHM et al., 1998; OFFORD et al., 2002) e os flavonoides naringina, rutina e quercetina (YEH et al., 2005) pode suprimir seu efeito pró-oxidante.

Uma das características desejáveis para filtros solares e antioxidantes utilizados em fotoprotetores é que eles sejam fotoestáveis, ou seja, que não sofram alterações na sua estrutura molecular ou na atividade fotoprotetora quando em contato com a luz do sol.

Estudos anteriores demonstram que alguns filtros solares perdem parte de sua capacidade fotoprotetora quando em contato com a radiação UV (DAMIANI et al., 2006; MARROT et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2007) e, ainda, que a fotoinativação não é um fenômeno que necessita de grandes doses de UV para acontecer (MAIER et al., 2001). Além disso, de acordo com Bonda, Zhang e Pavlovic (2011) o contato com a radiação UV pode reduzir significativamente a atividade antioxidante do *trans*-resveratrol. Portanto, o estudo da fotoestabilidade é de grande relevância na área de fotoproteção, visto que a fotolabilidade dos filtros solares e antioxidantes pode reduzir a proteção oferecida por essas moléculas contra a radiação UV (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; DAMIANI et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2007; MARROT et al., 2004), e que a fotolabilidade dos filtros solares pode ainda levar à formação de intermediários reativos, os quais podem promover dermatites de contato e reações fototóxicas na pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

Dessa forma, os fotoprotetores devem possuir uma associação de filtros solares estável frente à radiação UV para garantir sua eficácia, ou seja, para conferir proteção adequada contra as radiações UVA e UVB durante todo período de exposição ao sol. Igualmente, os antioxidantes adicionados à formulação, nesse caso o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno, também devem ser fotoestáveis para garantir a manutenção de sua ação antioxidante após irradiação. Assim, é de fundamental importância avaliar a fotoestabilidade de formulações fotoprotetoras contendo associação de filtros solares e antioxidantes.

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

Outro estudo relevante na área de fotoproteção é o de penetração cutânea de filtros solares e de antioxidantes em formulações fotoprotetoras, uma vez que, segundo Mavon et al. (2007) e Yang et al. (2008), os filtros solares devem permanecer na superfície da pele ou no estrato córneo para que sejam eficazes. Assim, é desejável que fiquem retidos no estrato córneo, a camada mais externa da pele, para que atinjam a maior proteção contra os raios UV com o menor grau possível de penetração transdérmica (GUPTA, 1999). A penetração de filtros solares através da pele pode resultar em efeitos tóxicos e indesejáveis ao organismo.

Em contrapartida, os antioxidantes devem ser capazes de penetrar até a epiderme e derme para oferecer proteção satisfatória contra a radiação UV, uma vez que os raios UVA, os quais são responsáveis pela geração excessiva de EROS, penetram profundamente a pele

(SAIJA et al., 2000). Dessa forma, uma vez que o grau de penetração dos antioxidantes e também dos filtros solares pode comprometer a eficácia e/ou a segurança das formulações, torna-se importante avaliar a penetração cutânea de novas formulações fotoprotetoras.

Finalizando, atualmente existem muitas informações acerca dos efeitos benéficos do *trans*-resveratrol e do beta-caroteno sobre os danos induzidos pelos raios UV, o que os torna potenciais substâncias a serem adicionadas aos filtros solares convencionais a fim de melhorarem sua performance. No entanto, pouca ou nenhuma informação em relação à penetração cutânea, bem como sobre a fotoestabilidade, desses antioxidantes em associação com a avobenzona e outros filtros solares é encontrada na literatura. Portanto, o presente estudo é de grande importância, uma vez que propôs a obtenção de novas formulações fotoprotetoras e a avaliação da sua fotoestabilidade e penetração cutânea, que constituem características relacionadas à eficácia e segurança de produtos cosméticos.

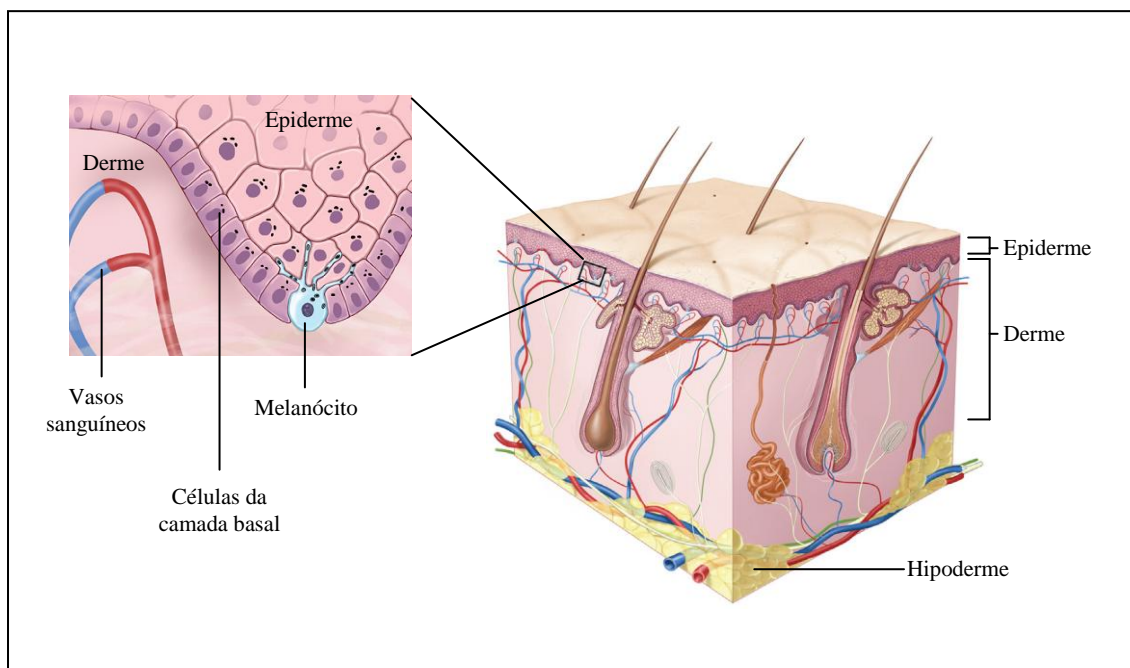
## ***2. Revisão de Literatura***



## 2.1. A pele e a radiação UV

A pele é o maior órgão do corpo humano, que reveste e delimita o organismo, sendo responsável por diversas funções no organismo, tais como, controle da temperatura corporal, síntese de vitamina D, e proteções física, química, imunológica, e também proteção contra os raios UV (CHUONG et al., 2002).

A pele é constituída por três camadas (Figura 1): a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme pode ser subdivida em estrato córneo (EC), o qual é composto por corneócitos e representa a principal barreira à entrada de fármacos na pele, e epiderme viável, que, além de queratinócitos, é constituída por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme viável, por sua vez, é subdivida em 3 camadas: granulosa, espinhosa e basal (CHUONG et al., 2002; MENON, 2002).



**Figura 1** – Representação das camadas da pele.

Fonte: Adaptado de National Cancer Institute. 2010. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/skin.pdf>. Acesso em 16 jul. 2013.

A camada granulosa é composta por células ricas em grânulos de queratohialina, os quais se tornam cada vez maiores à medida que essas células alcançam as camadas mais superficiais, refletindo o aumento da síntese de queratina. As células da camada granulosa também apresentam grande quantidade de corpos lamelares, que contém lipídios, e são secretados à medida que a diferenciação celular acontece. A camada espinhosa é caracterizada pela abundância em desmossomos e pela presença de corpos lamelares de Odland nas células

dessa camada. Por fim, a camada basal consiste em uma única camada de células colunares que contém organelas celulares e filamentos de queratina, e permanecem fixadas, por meio de hemidesmossomos, à membrana basal, a qual constitui a interface entre a epiderme e a derme (MENON, 2002). As células da camada basal são renovadas periodicamente, uma vez que se deslocam em direção à superfície da pele, sendo que, à medida que a migração acontece, as células sofrem diferenciação e se tornam cada vez mais queratinizadas. Quando as células estão totalmente queratinizadas elas passam a ser denominadas de corneócitos, e permanecem no EC até que ocorra descamação (EDWARDS; MARKS, 1995).

A derme está localizada logo abaixo da epiderme (Figura 1), e é constituída por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas. Nessa camada encontram-se células adiposas dérmicas, mastócitos, leucócitos e também fibroblastos, os quais são responsáveis pela síntese de pró-colágeno, elastina e glicosaminoglicanos, coletivamente denominados de matriz extracelular (MENON, 2002). A função primária da derme é nutrir a epiderme (camada avascular) e também proporcionar suporte mecânico à ela (DALY, 1982).

Os raios UV são responsáveis por diversos efeitos deletérios sobre a pele. Esses raios representam apenas a uma parte do espectro da radiação solar (5%), e podem ser subdivididos, em função de seus efeitos biológicos, em faixas de comprimento de onda que variam entre 200 e 400 nm, sendo que as faixas entre 290-320 nm e 320-400 nm correspondem, respectivamente aos raios UVB e UVA (NICHOLS; KATIYAR, 2010). Aproximadamente 90-99% dos raios UV emitidos pelo sol, que atingem a superfície terrestre, correspondem à radiação UVA, e 1-10% à UVB (MATSUI; DELEO, 1991).

Os raios UVA e UVB são capazes de desencadear diversos danos à pele, com intensidades diferentes, incluindo eritema, queimadura solar, hiperplasia, inflamação, hiperpigmentação, imunossupressão, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (BEISSERT SCHWARZ, 1999; KIELBASSA; ROZA; EPE, 1997; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002, 2004; PATHAK; JIMBOW; PARRISH, 1976; WLASCHEK et al., 1995). Esses efeitos têm importante papel na geração neoplasias, uma vez que os danos cumulativos do UV podem levar ao surgimento de lesões pré-cancerosas e cancerosas (MOAN; DAHLBACK; SETLOW, 1999; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SETLOW et al., 1993; WOOD et al., 2006).

O câncer de pele é caracterizado pela proliferação anormal das células que constituem a pele, podendo se manifestar em linhagens de células da epiderme (não-melanoma) ou em melanócitos (melanoma). O câncer de pele não-melanoma é o de maior incidência e menor

mortalidade entre os cânceres de pele, entretanto, o câncer de pele melanoma é o mais grave, devido à alta possibilidade de metástase (INCA). Adicionalmente, a incidência de melanoma tem aumentado de forma global nas últimas décadas. Segundo a *World Health Organization* (WHO), 132 mil casos de melanoma acontecem no mundo a cada ano. Além disso, no Brasil, foi estimado que em 2012 tenham surgido 6.230 novos casos de melanoma, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres (INCA).

Os danos cutâneos induzidos pela exposição aos raios UV são consequências da absorção direta de fótons pelo DNA celular e também de reações fotoquímicas iniciadas após absorção de fótons pelos cromóforos celulares. Dentre os diversos cromóforos presentes na epiderme humana, que possuem espectro de absorção dentro da faixa da radiação UV, podemos citar: a melanina e seus precursores; os aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano; o ácido urocânico; e os ácidos nucleicos (YOUNG, 1997).

O espectro de absorção da melanina abrange comprimentos de onda entre 200 e 900nm (ZONIOS et al., 2008), enquanto o do ácido urocânico vai de aproximadamente 200 a 300 nm (YOUNG, 1997). A incidência de radiação UV sobre esses cromóforos pode levar à formação de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), por meio da fotossensibilização dessas moléculas, e assim causar danos celulares (MENON; MORRISON, 2002; UCHOA et al., 2008).

A radiação UVB atinge as camadas mais superficiais da pele (epiderme) e é a principal responsável pelo bronzeamento tardio e formação do eritema cutâneo, que consiste em uma reação inflamatória iniciada após absorção da radiação UV por cromóforos da pele (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). O bronzeamento tardio é resultado do aumento da síntese de melanina pelos melanócitos induzida pelo UVB (PATHAK; JIMBOW; PARRISH, 1976), o que tem sido considerado um mecanismo de defesa do organismo, uma vez que a melanina é capaz de absorver fótons UVA e UVB (BRENNER; HEARING, 2008). Além disso, os raios UVB estão intimamente relacionados com o surgimento mutações no DNA decorrentes de lesões diretas e indiretas a esta molécula, que levam à formação de dímeros de pirimidina e a modificações oxidativas em sua estrutura (KIELBASSA; ROZA; EPE, 1997; MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2002).

Os raios UVA penetram profundamente a pele, atingindo a derme, e são os principais responsáveis pelo bronzeamento imediato e fotoenvelhecimento cutâneo. Os efeitos da radiação UVA sobre a pele são consequência da geração de EROS, como o  $^1O_2$ , por meio da fotossensibilização de cromóforos endógenos (TYRELL, 1994). O bronzeamento imediato ocorre por meio da oxidação da melanina já formada na pele (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004), e o fotoenvelhecimento pode ocorrer pelo aumento da

expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1), via  $^1\text{O}_2$ , aumentando, conseqüentemente, a degradação da matriz de colágeno (WLASCHEK et al., 1995). Além disso, o estresse oxidativo provocado pela UVA pode causar danos às macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e DNA, por meio da lipoperoxidação de membranas e da formação de produtos de fotooxidação no DNA (DARR; FRIDOVICH, 1994; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Após exposição à radiação UV são observadas alterações histológicas da pele, que incluem o espessamento do EC e a formação de edema intercelular e perivascular na derme. De forma mais detalhada, os queratinócitos se tornam mais irregulares, ocorre formação de uma massa desordenada de fibras elásticas, que passa a preencher a derme, e as fibras de colágeno passam a apresentar aspecto desordenado e coloração basofílica. Ainda na derme, os vasos sanguíneos se tornam dilatados e proeminentes e há um aumento de células inflamatórias (LAVKER et al., 1995 a, b; LOWE et al., 1995).

De acordo com estudos que avaliaram os efeitos do UV em faixas específicas de comprimento de onda, a radiação UVB é considerada mais citotóxica e mutagênica do que a UVA, sendo mais efetiva em causar danos fotoinduzidos, bronzeamento, eritema e câncer de pele camundongos (DE GRUIJL, 1995; PARRISH; JAENICKE; ANDERSON, 1982; YOUNG et al., 1998).

## **2.2. Fotoprotetores**

O conhecimento sobre os diversos efeitos deletérios que os raios UV podem provocar na pele, bem como a crescente incidência de casos de câncer de pele na população mundial, levou ao aumento da preocupação com a proteção contra a radiação solar (JOU; FELDMAN; TOMECKI, 2012). Dentre os meios disponíveis para alcançar proteção UVA e UVB, o uso de protetores solares, também designados fotoprotetores, está entre os mais utilizados e oferece proteção segura e eficaz contra o UV (NOHYNEK; SCHAEFERY, 2001).

Os fotoprotetores podem ser definidos como formulações cosméticas que contêm filtros solares e têm como finalidade proteger a pele contra a radiação UVB e UVA, por meio da absorção, dispersão ou reflexão da radiação (BRASIL, 2012b; GRANGER; BROWN, 2001). Os filtros solares utilizados nessas formulações podem ser físicos (filtros inorgânicos), que absorvem, refletem e dispersam os raios UV, ou químicos (filtros orgânicos), que absorvem em uma faixa específica da radiação UV (GRANGER; BROWN, 2001).

No desenvolvimento de formulações fotoprotetoras normalmente são utilizadas combinações de dois ou mais filtros solares com o objetivo de obter elevada proteção no UV e

minimizar possíveis irritações ou reações alérgicas na pele decorrentes de seu uso, uma vez que a utilização de diferentes filtros possibilita obter FPS e FP-UVA elevados com concentrações menores dessas substâncias (NOHYNEK; SCHAEFERY, 2001). Durante o desenvolvimento de fotoprotetores, também é importante utilizar combinações de filtros solares que proporcionem proteção adequada na faixa da UVA e da UVB (JOU; FELDMAN; TOMECKI, 2012).

Atualmente se observa uma tendência em associar aos filtros solares substâncias com atividade antioxidante visando melhorar o potencial das formulações para prevenir ou minimizar os danos induzidos pelo UV, mediados pelas EROS, uma vez que os filtros solares não oferecem proteção total contra as espécies reativas (EPSTEIN, 2011).

O organismo possui antioxidantes endógenos, enzimáticos (glutaciona peroxidase, catalase, superóxido dismutase, entre outros) e não enzimáticos (glutaciona, alfa-tocoferol, ascorbato, beta-caroteno, entre outros), eficientes no combate às EROS geradas na pele (STEENVOORDEN, BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). Entretanto, a exposição à radiação UV induz a uma produção excessiva de tais espécies, que supera a capacidade protetora intrínseca ao organismo humano (BLACK et al., 1983).

Assim, o uso dos antioxidantes em fotoprotetores pode então ser justificado pela necessidade de proteção à pele e pela falha dos filtros solares na neutralização das EROS formadas pela exposição ao UV, uma vez que nenhum fotoprotetor apresenta 100% de proteção à radiação solar (BRASIL, 2012b). Além disso, a absorção de radiação UV por alguns filtros solares também pode levar à formação de EROS, o que corrobora a necessidade de utilizar moléculas com propriedades antioxidantes em fotoprotetores (CHAUDHURI et al., 2006; HANSON et al., 2006; LEWICKA et al., 2013; LHIAUBET-VALLET et al., 2010).

### **2.2.1. Filtros solares**

Os filtros solares minimizam ou evitam os danos causados pelo UV ao absorver, refletir ou dispersar a radiação, impedindo assim a interação entre os fótons dos raios UV e as moléculas do organismo (GRANGER; BROWN, 2001).

Além da classificação quanto ao mecanismo de proteção (inorgânicos e orgânicos), os filtros solares podem ser classificados em UVA, UVB ou UVA/UVB, dependendo da região do espectro ultravioleta em que absorvem radiação. A maioria dos filtros solares disponíveis no mercado são UVB, seguidos pelos filtros UVA/UVB e por um reduzido número de filtros UVA (SHAATH, 2010).

Atualmente, existem apenas dois filtros solares inorgânicos aprovados para uso em fotoprotetores: o óxido de zinco (ZnO) e o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Esses óxidos metálicos são classificados como filtros UVA/UVB, pois são capazes de absorver, refletir e dispersar raios UVA e UVB (SHAATH, 2010). Apesar de proporcionarem proteção efetiva contra o UV, a tradicional opacidade que os óxidos metálicos conferem aos fotoprotetores representa uma desvantagem, pois contraria o apelo estético das formulações cosméticas ao dificultar sua espalhabilidade e deixar a pele com aspecto esbranquiçado (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Uma forma de melhorar o sensorial de formulações contendo esses filtros solares é a utilização de partículas micronizadas e revestidas (SHAATH, 2010).

A indústria de cosméticos tem à disposição diversos filtros solares orgânicos, os quais são agrupados em diferentes classes, de acordo com sua estrutura química. Entre as principais classes estão os aminobenzoatos, os salicilatos, os cinamatos, as benzofenonas, os derivados da cânfora e os dibenzoilmetanos. Outros filtros solares aprovados para uso em cosméticos, que não se enquadram em nenhuma dessas classes, são o octocrileno, a octiltriazone e o bemotrizinol (SHAATH, 2010).

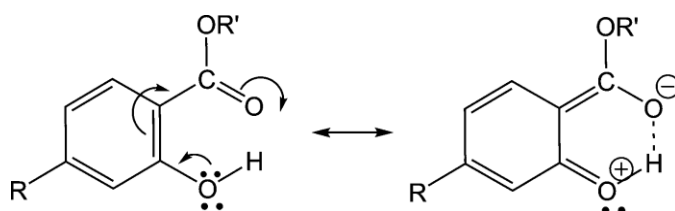
Os aminobenzoatos são derivados do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), e estão entre os primeiros filtros solares a serem utilizados em fotoprotetores. Essas moléculas apresentam absorção máxima em aproximadamente 290 nm, e têm estrutura química caracterizada pela presença de um anel aromático dissubstituído em posição *para* por um grupo doador de elétron (NR<sub>2</sub>) e um grupo um grupo aceptor de elétrons (COOR), que permite deslocalização dos elétrons (Figura 2) (SHAATH, 2010).



**Figura 2** – Representação da deslocalização de elétrons do PABA.  
Fonte: SHAATH, 2010.

Entre os derivados do PABA estão o amildimetil PABA e o octildimetil PABA. Atualmente, os aminobenzoatos são pouco utilizados em fotoprotetores devido ao seu elevado potencial fotoalergênico (GERBERICK; RYAN, 1989; NASH, 2006), em virtude do qual surgiu o *claim* dos produtos PABA-*free*, ou seja, que não contém PABA (NASH, 2006).

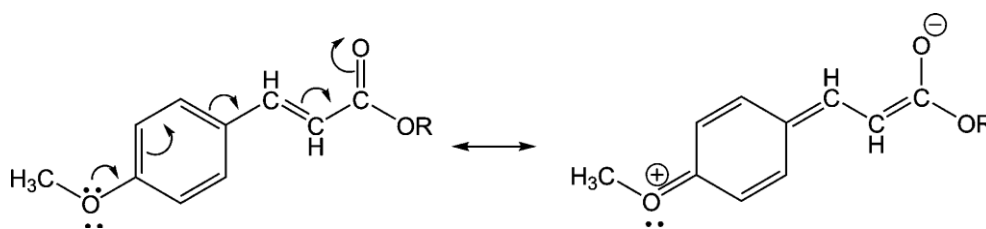
Os salicilatos também estão entre os primeiros filtros solares empregados em fotoprotetores, e são caracterizados quimicamente pela presença de um anel aromático dissustituído em posição *orto* por um grupo doador de elétron (OH) e um grupo aceptor de elétrons (COOR), que permite deslocalização da nuvem eletrônica (Figura 3) (SHAATH, 2010). Seus principais representantes são o salicilato de etil-hexila e homosolato, os quais apresentam absorção na faixa da radiação UVB (GONZÁLEZ et al., 2008).



**Figura 3** – Representação da deslocalização de elétrons dos salicilatos.  
Fonte: SHAATH, 2010.

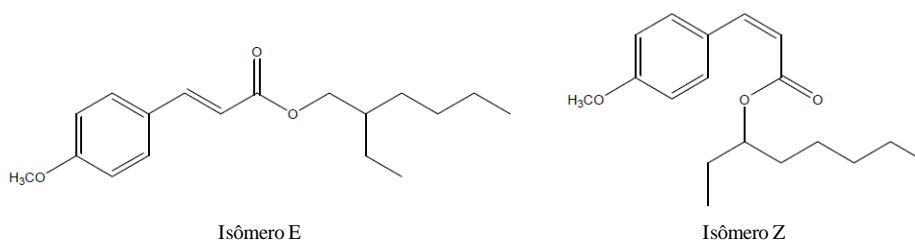
Os salicilatos possuem diversas vantagens, incluindo excelente estabilidade, ausência de potencial sensibilizante (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005) e perfil toxicológico favorável (GONZÁLEZ et al., 2008). Os salicilatos podem ainda ser utilizados como solventes para auxiliar a solubilização de outros filtros solares (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Entretanto, os filtros solares pertencentes a essa classe são considerados fracos absorvedores dos raios UV, sendo necessário utilizar altas concentrações desses filtros para compensar sua baixa absorção (ROELANDTS et al., 1998).

Os cinamatos são representados por moléculas com anel aromático dissustituído em posição *para* por um grupo doador de elétron (OCH<sub>3</sub>) e um grupo aceptor de elétrons (éster conjugado com dupla ligação), o que possibilita a deslocalização eletrônica (Figura 4) (SHAATH, 2010).



**Figura 4** – Representação da deslocalização de elétrons dos cinamatos.  
Fonte: SHAATH, 2010.

Na presença da luz UV, os cinamatos podem sofrer isomerização entre os isômeros *cis* (*Z*) e *trans* (*E*). O isômero *E*, que apresenta  $\lambda_{\text{máx}}$  de 310 nm e coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) de  $19500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , é a forma utilizada em fotoprotetores, enquanto o *Z* apresenta  $\epsilon$  muito inferior ao *E* ( $10000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), o que leva à absorção UVB reduzida (SHAATH, 2010).



**Figura 5** – Estrutura do o *E*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato e *Z*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato deslocalização de elétrons dos cinamatos.

Fonte: Adaptado de Pattanaargson et al. (2004).

O metoxicinamato de etil-hexila apresenta absorção máxima em 311 nm, é o principal representante dos cinamatos e também o mais utilizado mundialmente (GONZÁLEZ et al., 2008). Conforme descrito por Shaath (2010), estudos anteriores mostraram que o *E*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato sofre fotoisomerização após exposição ao UV, originando o *Z*-etil-hexil-*p*-metoxicinamato (Figura 5) (PATTANAARGSON; LIMPHONG, 2001; PATTANAARGSON et al., 2004).

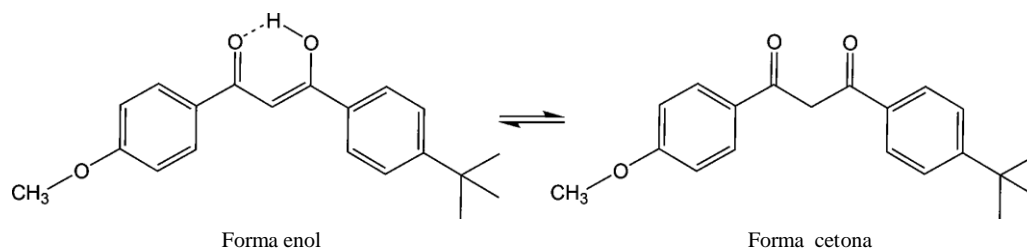
As benzofenonas são cetonas aromáticas que absorvem em um amplo espectro do UV, aproximadamente de 270 a 350 nm (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Entre os principais representantes dessa classe estão a benzofenona-3 (oxibenzona), benzofenona-4 e benzofenona-8. Segundo Schallreuter et al. (1996), a oxibenzona é fotoinstável, podendo gerar espécies reativas na presença do UV, e tem sido considerada como um potencial alergênico e associada com dermatites de contato e fotoalérgicas (SCHAUDER; IPPEN, 1997; SCHALLREUTER et al., 1996). Também já foi observado que a oxibenzona possui absorção sistêmica, e pode ser detectada em amostras de urina e sangue (JANJUA et al., 2004).

Os derivados da cânfora podem sofrer fotoisomerização reversível entre as suas formas *cis*- e *trans*-, e são considerados fotoestáveis (SHAATH, 2010). Entre os seus representantes estão o 4-metilbenzilideno cânfora e o ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Este último é um filtro de amplo espectro,



com perfil de absorção entre 290 a 390 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  em 345 nm), que apresenta absorção sistêmica ínfima e boa fotoestabilidade (TUCHINDA, 2006).

Os dibenzoilmetanos são representados por moléculas com elevado  $\epsilon$ , que absorvem principalmente na região da UVA. Essas moléculas proporcionam proteção efetiva contra os raios UVA, sendo o butil metoxidibenzoilmetano (avobenzona) seu principal representante, o qual possui um espectro de ação no UV que vai de 310 a 400 nm, com  $\lambda_{\text{máx}}$  em torno de 360 nm (SHAATH, 2010). A avobenzona pode sofrer tautomerismo ceto-enólico (Figura 6), sendo que, em solução, há um equilíbrio entre a forma enol e cetona, o qual é deslocado em direção à forma enol, que apresenta excelente absorção no UVA. Entretanto, na presença da radiação UV, o equilíbrio é deslocado em direção à forma cetona, que apresenta absorção entre 260 a 280 nm (MTURI; MARTINCIGH, 2008). A forma cetona da avobenzona pode absorver fótons UV e ser excitada ao estado tripleto, onde pode interagir com outros filtros solares, levando à formação de fotoprodutos, ou transferir sua energia para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), formando  $^1\text{O}_2$ . O  $^1\text{O}_2$  então formado pode interagir com a molécula de avobenzona na forma enol, e também com outros filtros solares, levando à formação de fotoprodutos (LHIAUBET-VALLET et al., 2010).



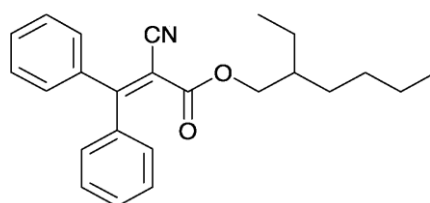
**Figura 6** –Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona.

Fonte: SHAATH, 2010.

De forma geral, na presença da radiação UV, a avobenzona pode sofrer reações de tautomerização, fragmentação e formação de fotoprodutos, o que resulta na perda do seu efeito fotoprotetor, uma vez que ocorre redução da forma enol, que tem  $\lambda_{\text{máx}}$  de 360 nm com concomitante aumento da forma cetona, que apresenta absorção entre 260 a 280 nm (DAMIANI et al., 2006; LHIAUBET-VALLET et al., 2010; PARIS et al., 2009; SCHWACK; RUDOLPH, 1995). Chatelain e Gabard (2001) observaram que, após a irradiação por UV, houve uma elevada degradação da avobenzona (entre 56 a 70%). Além disso, a avobenzona

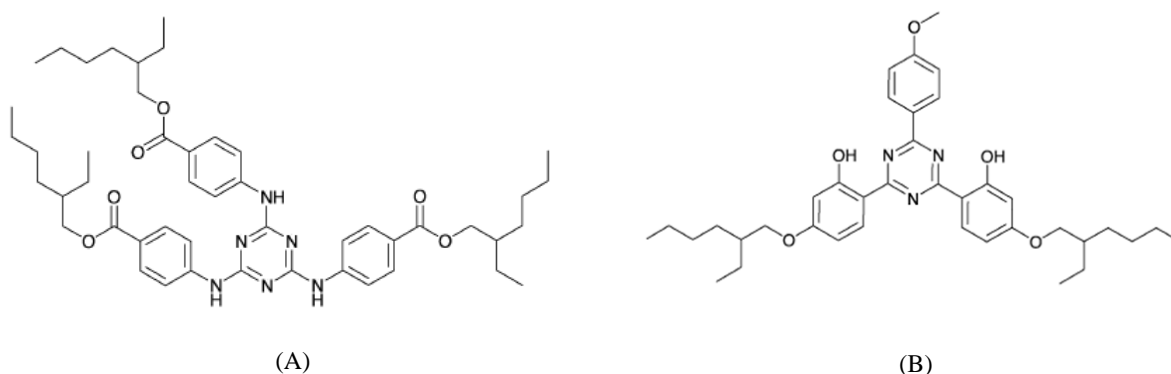
pode perder 50% da sua capacidade fotoprotetora após 1 hora de exposição ao UV, se não for estabilizada adequadamente (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

O octocrileno (Figura 7) é um cianoacrilato capaz de absorver radiação UV na faixa de 290 a 360 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  em 307 nm). Esse filtro solar apresenta baixo potencial irritante, fototóxico e fotoalérgico, o que indica um excelente perfil de segurança (NASH, 2006). O octocrileno pode ser utilizado como filtro solar e também como fotoestabilizador, uma vez que atua como *quencher* do estado excitado tripleto (SHAATH, 2010).



**Figura 7** – Estrutura molecular do octocrileno.  
Fonte: Adaptado de Lhiaubet-Vallet et al. (2010).

A octiltriazone e o bemotrizinol (Figura 8) são derivados de triazina. Essas moléculas foram desenvolvidas recentemente, e apresentam elevado peso molecular (> 500 Daltons), com o objetivo de diminuir sua penetração na pele.



**Figura 8** –Estrutura molecular da octiltriazone (A) e do bemotrizinol (B).  
Fonte: Adaptado de Lhiaubet-Vallet et al., 2010.

A octiltriazone possui peso molecular de 823 Daltons, é um filtro solar UVB fotoestável ( $\lambda_{\text{máx}}$  de 314 nm) e apresenta em sua estrutura molecular (Figura 8) núcleos característicos dos aminobenzoatos (Figura 2) (SHAATH, 2010). Já o bemotrizinol (629 Daltons) é um filtro solar que absorve radiação em uma ampla faixa da radiação UV, de 290 a

390 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  de 310 e 343 nm) e também apresenta boa fotoestabilidade (TUCHINDA, 2006; SHAATH, 2010).

### 2.2.2. Antioxidantes

Um radical livre pode ser definido como uma molécula que apresenta um elétron desemparelhado em um orbital atômico. A presença de um elétron desemparelhado resulta em instabilidade molecular e alta reatividade, propriedades comuns à maioria dos radicais. Esses radicais podem então doar ou receber elétrons de outras moléculas, atuando como oxidantes ou redutores (CHEESEMAN; SLATER, 1993). Os radicais livres centrados no oxigênio são conhecidos como EROS, e incluem os radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), alcóxil ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), hidroxil ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), entre outros, e também o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o  $^1\text{O}_2$  (LOBO et al., 2010; PIETTA, 2000).

A geração de EROS pode ocorrer após incidência das radiações UVA e UVB sobre a pele devido à absorção dos fótons pelos cromóforos da pele, os quais passam a um estado excitado, por transição eletrônica, podendo sofrer reações fotoquímicas que resultam na formação de tais espécies reativas (WLASCHEK et al., 2001).

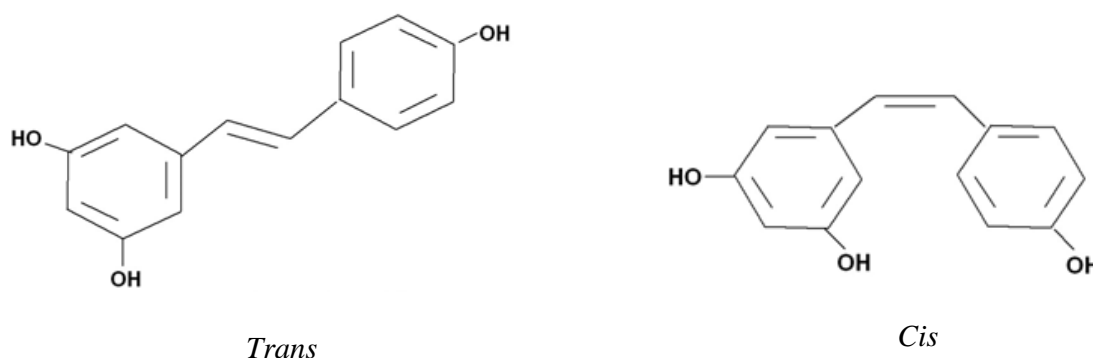
Os antioxidantes são substâncias que retardam, previnem ou reparam os danos oxidativos à uma molécula alvo (HALLIWELL, 2007). De forma geral, os antioxidantes protegem a pele das EROS inibindo sua formação ou, interrompendo sua propagação por meio de um, ou mais, dos seguintes mecanismos: 1) interceptação das espécies pró-oxidantes iniciais; 2) seqüestro de metais pesados, prevenindo eventos de iniciação e propagação das reações que produzem radicais livres; 3) interceptação de radicais secundários os quais podem propagar reação em cadeia ou reduzir grupos oxidados; 4) reparo de macromoléculas e renovação celular (TEDESCO, 1997).

Diversos antioxidantes naturais têm sido empregados em formulações fotoprotetores devido às suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, tais como vitaminas, polifenóis e carotenóides (GONZÁLEZ et al., 2008; GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010). Entre os antioxidantes clássicos empregados em fotoprotetores estão as vitaminas C e E, e o beta-caroteno, cujos efeitos fotoprotetores contra os raios UV são bem caracterizados (GONZÁLEZ et al., 2008; GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; PINNEL, 2003).

Os polifenóis, mais especificamente os provenientes da dieta, possuem atividade antiinflamatória, imunomoduladora e antioxidante e estão entre o grupo de compostos mais promissor que pode ser explorado como agentes preventivos contra diversas desordens da pele em geral, e em particular, o câncer de pele. A maioria dos polifenóis pode absorver a

radiação UV em todo espectro UVB e em parte do espectro UVA. Desta maneira esses compostos, além de atuarem como antioxidantes, podem também atuar como filtros solares orgânicos, sendo capazes de reduzir a inflamação, o estresse oxidativo e os danos ao DNA induzidos pela radiação UV na pele (NICHOLS; KATIYAR, 2010).

O resveratrol é um polifenol pertencente à classe dos estilbenos, que pode ser encontrado na forma *cis*- e *trans*- (Figura 9), sendo a última considerada a mais estável e biologicamente ativa (BAXTER, 2007). Este estilbeno é sintetizado por uma grande variedade de plantas em resposta à exposição à radiação UV (VAN ETTEN et al., 1994) e apresenta, assim como outros polifenóis, atividades antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e imunomoduladora. Seus efeitos antitumorais podem ser atribuídos à regulação do ciclo celular e indução da apoptose, regulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, entre outros (SHANKAR; SINGH; SRIVASTAVA, 2007).



**Figura 9** –Estrutura molecular do *trans*- e *cis*-resveratrol.

Fonte: Adaptado de Shankar, Singh e Srivastava (2007).

Assim como ocorre para outros compostos fenólicos, a ação antioxidante do resveratrol pode ocorrer por meio de dois mecanismos: por transferência de átomos de hidrogênio para as EROS, ou por transferência de elétrons, seguida da transferência de prótons, para as EROS (DZEBA; PEDZINSKI; MIHALJEVIC, 2012).

De acordo com Miura et al. (2000), o resveratrol é um forte inibidor da peroxidação lipídica e eficiente sequestrador de radicais ROO<sup>•</sup>. Ainda, segundo o estudo de Stojanovic, Sprinz e Brede (2001), o resveratrol foi extremamente eficiente no sequestro de radicais livres, uma vez que apresentou 95% de eficiência na prevenção da peroxidação lipídica, em comparação com as vitaminas E e C, que apresentaram eficiência em torno de 65% e 37%, respectivamente.

No estudo de Aziz, Afaq e Ahmad (2005), foi observado que a aplicação tópica do resveratrol inibe a iniciação, a promoção e a progressão de tumores na pele induzidos pela radiação UVB. Além disso, outros estudos têm demonstrado a atividade inibitória do resveratrol em vários tipos de câncer, incluindo o de pele (PEZZUTO, 2008). Adicionalmente, em linhagem de fibroblastos (ZHANG et al., 2007) e em melanomas (FERRER et al., 2005) o tratamento com resveratrol resultou na ativação da atividade do gene p53, o qual é responsável por preservar a integridade do DNA, que pode ser comprometida pela exposição ao UV, por meio do seu reparo e da indução da apoptose.

Os efeitos fotoprotetores do resveratrol também foram observados em outros estudos, nos quais sua aplicação tópica em camundongos SKH-1 *hairless* resultou em inibição significativa de danos induzidos pela radiação UVB na pele, incluindo edema (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003; REAGAN-SHAW et al., 2004), inflamação, geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica (AFAQ; ADHAMI; AHMAD, 2003), hiperplasia e infiltração de leucócitos (REAGAN-SHAW et al., 2004).

Na presença da luz visível e da radiação UV o *trans*-resveratrol pode sofrer isomerização à sua forma *cis*- (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011), a qual não possui atividade biológica significativa (BAXTER, 2007). Além disso, de acordo com Bonda, Zhang e Pavlovic (2011), o contato com a radiação UV pode causar fotodegradação do *trans*-resveratrol e reduzir significativamente sua atividade antioxidante, sendo que esse efeito pode ser minimizado na presença do etil-hexil metoxicrileno, um fotoestabilizador.

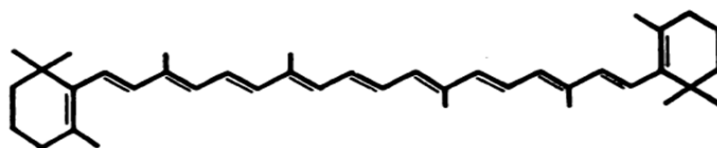
Os carotenóides são pigmentos presentes em abundância em frutas e vegetais os quais desempenham diversas funções relacionadas à fotobiologia, à fotoquímica e à medicina, em virtude de sua atividade antioxidante (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997). Mais de 600 carotenóides já foram identificados na natureza, sendo que aproximadamente 40 estão presentes na dieta humana e são representados principalmente pelo alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (GESTER, 1997).

O beta-caroteno é um antioxidante endógeno, encontrado na pele (HATA et al., 2000), que apresenta ação seqüestradora de radicais livres e é considerado o mais abundante e eficiente precursor da vitamina A (BAYERL, 2008). A ação antioxidante do beta-caroteno está baseada na sua capacidade de atuar como *quencher* do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e de substâncias no estado tripleto, dissipando a energia do estado excitado (MORTENSEN, 2001; NIELSEN et al., 1998). Além disso, esse carotenóide também pode inibir a oxidação provocada por radicais ROO• (YANISHLIEVA; AITZETMÜLLER; RANEVA, 1998) e O<sub>2</sub>• (CONN et al., 1992) por meio da transferência de elétrons para essas espécies reativas. Entretanto, processos anti e

pró-oxidativos podem ocorrer em consequência da ação antioxidante do beta-caroteno, uma vez que podem ser formados radicais desse carotenóide (BURTON; INGOLD, 1984).

A estrutura molecular do beta-caroteno (Figura 10), rica em duplas ligações conjugadas, é responsável por sua excelente habilidade em atuar como *quencher* do singlete sem sofrer degradação e também por sua reatividade química frente a radicais livres (BRITTON, 1995; KRINSKY, 1994).

O beta-caroteno apresenta, além de elevada ação antioxidante (DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998), atividades anti-câncer (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007) e antiinflamatória (BAI, 2005). Diversos estudos relataram a proteção oferecida pelo beta-caroteno contra a radiação UV e também infravermelha (BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998).



**Figura 10** – Estrutura molecular do beta-caroteno.  
Fonte: Adaptado de Driskell, Bashor e Neese (1983).

No estudo realizado por Darvin et al. (2011), a aplicação tópica de uma formulação contendo beta-caroteno conferiu proteção à pele humana contra a ação de radicais livres, formados em consequência da exposição à radiação infravermelha. Outros estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação tópica de beta-caroteno conferiu proteção contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA (EVELSON et al., 1997; YASUI; SAKURAI, 2000).

Atualmente existem controvérsias sobre os reais efeitos fotoprotetores do beta-caroteno. Enquanto muitos autores encontraram efeito quimiopreventivo e ação antioxidante, o que torna o uso do beta-caroteno interessante em fotoprotetores, outros encontraram agravamento dos efeitos de alguns tipos de câncer e ação pró-oxidante (BIESALSKI; OBERMUELLER-JEVIC, 2001). Entretanto, estudos mostram que a associação do beta-caroteno a outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E (BÖHM et al., 1998; OFFORD et al., 2002) e os flavonóides naringina, rutina e quercetina (YEH et al., 2005) pode suprimir seu efeito pró-oxidante, por reduzir a oxidação desse carotenóide; além disso, sua associação com as vitaminas C e E pode ainda promover um efeito antioxidante sinérgico (BÖHM et al., 1998).

Os polifenóis parecem ter efeitos antioxidantes muito superiores aos das vitaminas que também possuem essa ação (BAXTER, 2007), sendo que Stojanovic, Sprinz e Brede (2001) mostraram que o *trans*-resveratrol foi mais eficiente no sequestro de radicais livres do que as vitaminas C e E, as quais já são encontradas em formulações fotoprotetoras presentes no mercado. Adicionalmente, a associação do beta-caroteno a outros antioxidantes se mostrou promissora em estudos anteriores (BÖHM et al., 1998; OFFORD et al., 2002; YEH et al., 2005), apesar de ainda não existirem dados suficientes para afirmar que isoladamente tal carotenóide é um agente fotoprotetor eficaz.

### **2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores**

Uma das etapas finais do desenvolvimento de formulações fotoprotetoras consiste na realização de testes com o intuito de avaliar diversas características relacionadas à segurança e à eficácias dessas formulações, incluindo estabilidade (organoléptica, físico-química e microbiológica), fotoestabilidade, irritação, sensibilização, penetração cutânea, determinação do fator de proteção solar (FPS) e do fator de proteção UVA (FP-UVA), determinação da resistência à água e da amplitude da proteção UV, entre outras (BRASIL, 2004; BRASIL, 2012b; NASH et al., 2006).

Uma das finalidades do estudo da estabilidade de produtos cosméticos é obter informações que permitam monitorar a estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, gerando informações sobre sua confiabilidade e segurança. Entre os parâmetros avaliados nesse estudo estão os organolépticos (aspecto, cor e odor), os físico-químicos (pH, viscosidade, densidade, e em alguns casos, o monitoramento de ingredientes da formulação) e os microbiológicos (contagem microbiana e teste de desafio do sistema conservante). Os estudos de estabilidade podem ser divididos em preliminar, que tem o objetivo de auxiliar e orientar a escolha das formulações, acelerada e de prateleira ou de longa duração. Antes de iniciar esses estudos é recomendado que a formulação seja submetida ao teste de centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos (BRASIL, 2004).

#### **2.3.1. Fotoestabilidade**

A fotoestabilidade é a capacidade de uma molécula de, após absorver de fótons da radiação UV, não sofrer alterações na sua estrutura molecular. A absorção de um fóton pelo filtro solar orgânico leva à excitação dessa molécula, que estava no estado fundamental, ao estado excitado singlete. Nesse estado, a energia absorvida pode ser dissipada por meio de desativação vibracional ou da emissão de um fóton (fluorescência), ou a molécula excitada

pode sofrer reações fotoquímicas, tais como fotodegradação, formação de radicais livres ou formação de fotoprodutos (isomerização ceto-enólica ou *cis-trans*). Além disso, a molécula no estado excitado singleto, pode passar para o estado excitado tripleto através da transição intersistemas. Uma vez, no estado excitado tripleto, a molécula pode dissipar a energia por meio da emissão de um fóton (fosforescência) ou sofrer reações fotoquímicas, que levam à formação de radicais  $\text{ROO}^\bullet$  e de  $^1\text{O}_2$  (LIM; DRAELOS, 2009). De uma maneira geral, quando a molécula não consegue dissipar a energia radiante absorvida, podem ocorrer reações de fotodegradação, formação de radicais e de fotoprodutos, as quais caracterizam fotoinstabilidade (SHAATH, 2010). Assim, o ideal é que as moléculas retornem ao estado fundamental dissipando a energia UV absorvida, sem sofrer reações fotoquímicas.

Diversos estudos têm mostrado que a incidência de radiação UV sobre filtros solares e antioxidantes pode levar, respectivamente, à redução ou perda da capacidade fotoprotetora e atividade antioxidante, devido à fotolabilidade e também à fotorreatividade frente ao UV (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; DAMIANI et al., 2006; HAYWOOD et al., 2003; MAIER et al., 2001; MARROT et al., 2004; MAIER et al., 2005; SERPONE et al., 2002; TARRAS-WAHLBERG et al., 1999). Além disso, filtros solares fotoinstáveis podem levar à formação de intermediários reativos que são prejudiciais ao organismo e que podem ser absorvidos promovendo dermatites de contato e reações fototóxicas na pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

Alguns filtros solares e antioxidantes empregados em fotoprotetores, tais como a avobenzona e a vitamina A (DAMIANI et al., 2006; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007), são muito fotoinstáveis. Além disso, de acordo com Bonda, Zhang e Pavlovic (2011), o contato do *trans*-resveratrol com a radiação UV pode reduzir significativamente a atividade antioxidante dessa molécula.

A fotoestabilidade da avobenzona pode ser alterada dependendo da combinação de filtros solares utilizada. Dondi, Albini e Serpone (2006) descreveram o mecanismo de fotodegradação da avobenzona e do metoxicinamato de etil-hexila em virtude das fotorreações que ocorrem entre essas moléculas. Entretanto, apesar de a fotolabilidade da avobenzona já ser bem estabelecida na literatura, ela é ainda um dos filtros UVA mais utilizados em fotoprotetores (PARIS et al., 2009).

Os filtros solares inorgânicos ( $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$ ) também absorvem radiação UV, e como consequência disso, podem ser formadas EROS, que podem interagir com os filtros orgânicos (BUCHALSKA et al., 2010; LEWICKA et al., 2013). Dessa forma o  $\text{TiO}_2$  e o  $\text{ZnO}$  podem afetar a fotoestabilidade dos filtros orgânicos, devido a sua habilidade em gerar EROS, após



absorção de fótons da radiação UV, incluindo radicais  $\bullet\text{OH}$  e o  $^1\text{O}_2$  (BUCHALSKA et al., 2010; SCHWITZGEBEL et al., 1995) e  $\text{O}^{2-\bullet}$  (KONAKA et al., 2001). As espécies reativas geradas por esses óxidos metálicos podem causar degradação de outros filtros solares, por meio de fotocatalise, danos à pele, ou ambos (WAKEFIELD et al., 2004).

A fotoestabilidade dos filtros solares e de antioxidantes em fotoprotetores pode ser melhorada através da adição de fotoestabilizadores. Os fotoestabilizadores reduzem a possibilidade de essas moléculas participarem de reações químicas, e podem atuar de duas maneiras: por estabilização estrutural e geométrica da molécula, através de interações eletrostáticas e de Van der Waals, ou por dissipação da energia absorvida pela molécula, o que acontece quando o fotoestabilizador recebe o elétron da molécula (BONDA, 2007).

O octocrileno e o bemotrizinol são exemplos de fotoestabilizadores, os quais são capazes de melhorar a estabilidade da avobenzona (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007; CHATELAIN; GABARD, 2001). Entretanto, apesar de já existirem fotoestabilizadores disponíveis no mercado, no caso da avobenzona, os existentes não são capazes de neutralizar os radicais livres formados pela sua fotofragmentação (CHAUDHURI et al., 2006).

As descobertas sobre as consequências da utilização de filtros solares e antioxidantes fotoinstáveis em fotoprotetores tem atraído o interesse de vários pesquisadores em direção aos estudos de fotoestabilidade. Nesses estudos, os métodos analíticos que têm sido mais empregados consistem em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrofotometria no UV (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2010; GONZÁLEZ et al., 2007; MAIER et al., 2001).

A análise por CLAE permite avaliar a fotoestabilidade de cada molécula utilizada no fotoprotetor. Enquanto que, a análise espectrofotométrica permite avaliar a fotoestabilidade da formulação como um todo, já que o espectro de absorção é resultado da absorbância de todas as moléculas presentes na formulação. Apesar de a análise espectrofotométrica poder ser afetada por artefatos ópticos, tais como fotoprodutos que também absorvem a radiação UV (STOKES; DIFFEY, 1999), as informações obtidas nessas análises são relevantes para o estudo de fotoestabilidade. Assim, no estudo de fotoestabilidade de fotoprotetores, é fundamental utilizar os dois métodos, CLAE e espectrofotometria, para obter uma análise mais detalhada e completa.

Na avaliação da fotoestabilidade de fotoprotetores, as formulações normalmente são espalhadas em lâminas de vidro (DAMIANI et al., 2010, GASPAR; MAIA CAMPOS, 2010). Crovara Pescia et al. (2012), que avaliaram a fotoestabilidade de fotoprotetores em lâminas de vidro e em pele humana e de porco, observaram que a performance dos fotoprotetores após

exposição à radiação UVA parece ser independente do substrato onde a formulação foi aplicada.

O ideal é que os fotoprotetores possuam uma associação de filtros solares estável frente à radiação UV para garantir sua eficácia, ou seja, para conferir proteção adequada contra as radiações UVA e UVB durante todo período de exposição ao sol. Igualmente, os antioxidantes adicionados à formulação devem ser fotoestáveis para garantir a manutenção de sua ação antioxidante após irradiação.

Atualmente, a legislação sanitária brasileira e também a norte-americana e a europeia não exigem das empresas, que queiram registrar e comercializar fotoprotetores, testes para a comprovação da fotoestabilidade das formulações. Entretanto, a comunidade científica tem chamado atenção à necessidade da realização de estudos para avaliar a fotoestabilidade dos fotoprotetores, uma vez que os filtros solares e antioxidantes podem sofrer alterações após exposição à radiação UV as quais podem comprometer não só a eficácia, mas também a segurança das formulações.

### **2.3.2. Avaliação da eficácia de fotoprotetores**

Na avaliação da eficácia das formulações, a determinação do FPS e do FP-UVA ocupam posição de destaque, uma vez que o FPS reflete a eficácia do fotoprotetor em relação à radiação UVB, e o FP-UVA em relação à UVA. O FPS é definido como a relação entre a dose mínima de radiação UV necessária para produzir uma reação de eritema na pele (DME) protegida por um fotoprotetor e a dose mínima de radiação UV necessária para produzir a mesma reação na pele desprotegida (BRASIL, 2012b). A dose mínima eritematosa (DME), por sua vez, é definida como a quantidade de energia radiante requerida para produzir a primeira reação de vermelhidão (eritematosa) perceptível com bordas claramente definidas, observada entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UV (PATHAK; FITZPATRICK, 1993).

A ANVISA recomenda que a determinação do FPS seja realizada por métodos *in vivo*, aplicando estritamente os guias atualizados disponibilizados pela FDA e COLIPA (BRASIL, 2012b). Entretanto, também existem metodologias *in vitro* para realizar essa determinação, baseadas em métodos espectrofotométricos, que permitem executar análises simples e rápidas e que, apesar de não serem aceitas para fins de registro do fotoprotetor, podem ser úteis como ferramenta de triagem durante o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras (MANSUR et al., 1986).

O FP-UVA é definido como a relação entre a dose mínima de radiação UVA necessária para produzir escurecimento pigmentário persistente na pele (DMP) protegida por um fotoprotetor e a dose mínima de radiação UVA necessária para produzir a mesma reação na pele desprotegida. Por sua vez, a dose mínima pigmentária (DMP), é definida como a dose mínima de radiação UVA requerida para produzir um escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas claramente definidas, observado entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA (BRASIL, 2012b).

A ANVISA recomenda que a determinação do FP-UVA seja realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro* reconhecidos e devidamente validados, sendo que as medidas *in vivo* e *in vitro* devem seguir, respectivamente, o guia recomendado pela *Japanese Cosmetic Industry Association* e o guia disponibilizado pela COLIPA (BRASIL, 2012b).

Na determinação do FP-UVA *in vitro* são utilizados métodos espectrofotométricos, que permitem a determinação da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico, que correspondem a medidas relativas do espectro de absorção do fotoprotetor. Tais medidas resumem as informações do espectro de absorção do fotoprotetor em apenas um número, que caracteriza a proteção UVA (comprimento de onda crítico) ou a proteção UVA em relação à UVB (razão UVA/UVB) (DIFFEY, 1994). Os métodos espectrofotométricos podem ser baseados na avaliação da transmitância de um fino filme de fotoprotetor espalhado em um substrato áspero (lâminas de polimetilmetacrilato), ou na avaliação da absorbância de uma solução, após exposição a uma dose de radiação UV controlada (DIFFEY et al., 2000; VELASCO et al., 2011).

O comprimento de onda crítico corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nm, e deve ser no mínimo equivalente a 370 nm (BRASIL, 2012b). A razão UVA/UVB corresponde à relação entre a integral do espectro de absorção na faixa da UVA (320-400nm) e a integral do espectro de absorção na faixa da UVB (290-320nm) (DIFFEY, 1994). O nível de proteção oferecido pelo fotoprotetor na faixa da UVA, determinado por meio da razão UVA/UVB, pode ser classificado através do *Boots Star Rating System*, o qual estabelece uma classificação do nível de proteção UVA baseada em estrelas (Tabela 1) (BOOTS THE CHEMISTS, 2004; LEVY, 2007).

**Tabela 1** – Classificação de acordo com o *Boot's Star Rating System* da proteção UVA oferecida pelo fotoprotetor com base na razão UVA/UVB.

Razão UVA/UVB	Estrelas	Descrição da proteção UVA
0,0 até < 0,2	-	Muito baixa
0,2 até < 0,4	*	Moderada
0,4 até < 0,6	**	Boa
0,6 até < 0,8	***	Superior
0,8 até < 0,9	****	Máxima
≥ 0,9	*****	Ultra

Fonte: Adaptado de Velasco et al. (2011).

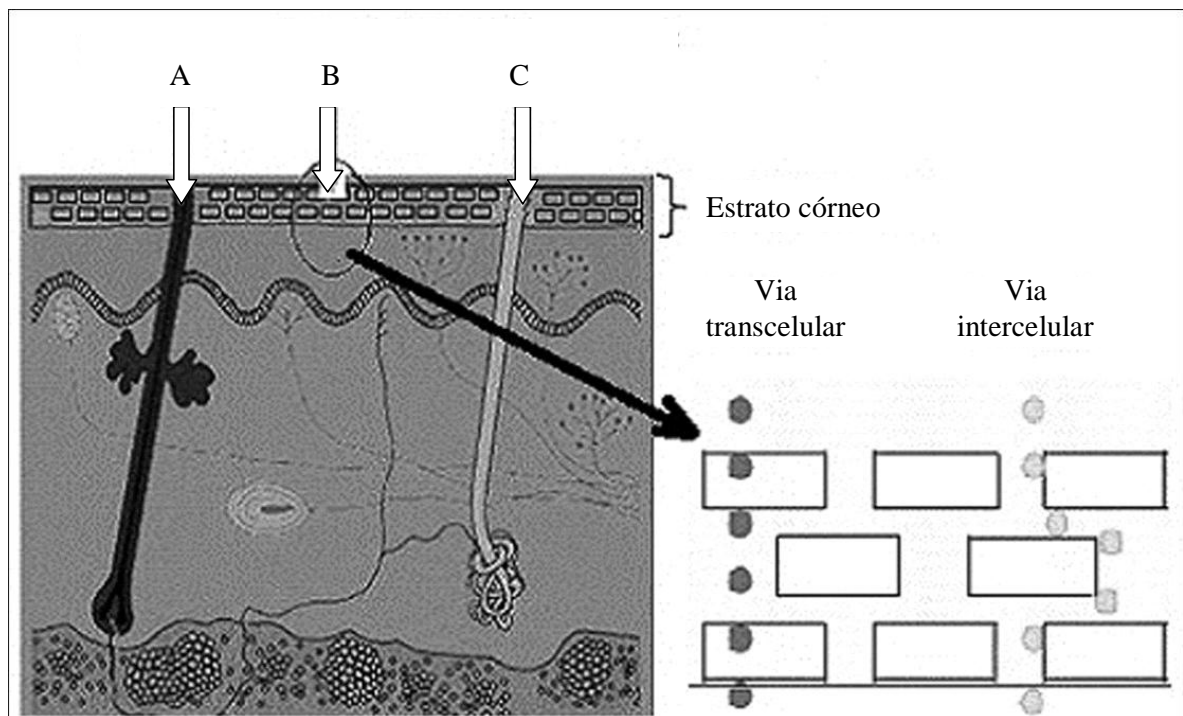
Além dos métodos *in vivo* e *in vitro* utilizados na determinação do FPS e do FP-UVA, existem metodologias *in silico*, como o *software BASF Sunscreen Simulator*, o qual permite realizar uma estimativa do FPS, do FP-UVA, da proteção UVA e da proteção UVA/UVB oferecida pelo fotoprotetor, de acordo com a combinação e a concentração dos filtros solares selecionados e com a quantidade aplicada (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0mg/cm<sup>2</sup>). Nesse *software* diversos parâmetros de proteção UVA/UVB são considerados, de acordo com as normas da região selecionada (Mercosul, Estados Unidos, Europa, Austrália, Japão) ou de forma global.

### 2.3.3. Penetração e permeação cutâneas

Uma das principais funções da pele é atuar como barreira evitando a perda de água, eletrólitos, principalmente, e também a entrada de moléculas do meio externo (LAFFORGUE; MARTY, 2007). Na pele, o estrato córneo, que apresenta espessura de aproximadamente 10 a 20 µm, é a primeira e a principal barreira à absorção percutânea de substâncias, bem como à perda transepidérmica de água (BOUWSTRA et al., 2003).

O estrato córneo pode ser descrito como uma “parede de tijolos” onde as células queratinizadas (corneócitos) são circundadas por uma matriz de lipídeos organizada em bicamadas e constituída por ceramidas (45-50%), colesterol (25%), ácidos graxos (10-15%) e por outros lipídios (5%), sendo o sulfato de colesterol o mais importante deles. Os corneócitos são envolvidos por um envelope proteico, que possui filamentos de queratina em seu interior e ceramidas de cadeia longa (hidroxiceramidas) em sua superfície. A composição do estrato córneo e a disposição dos corneócitos e da matriz lipídica, que forma um caminho tortuoso, tornam essa camada da epiderme o principal obstáculo à penetração cutânea de substâncias (MADISON, 2003).

A passagem de uma molécula através da pele por difusão passiva pode ocorrer principalmente pelas vias intercelular e transcelular, podendo ocorrer também via apêndices (Figura 11). Na penetração pela via intercelular, o soluto se difunde ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica, enquanto que pela via intracelular, o soluto passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular. Na penetração através dos apêndices, as substâncias podem passar através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. No entanto, esses apêndices ocupam apenas 0,1% da superfície total da pele humana e, por isso, sua contribuição na penetração é considerada pequena (MOSER et al., 2001; RASTOGI; YADAV, 2012). A penetração cutânea não ocorre unicamente por uma das três vias, ou seja, todas participam do processo de difusão, sendo a penetração global resultado da passagem das substâncias através do estrato córneo e dos anexos da pele (MOSER et al., 2001).



**Figura 11** – Vias de penetração cutânea: folículo piloso (A), estrato córneo transcelular e intercelular (B), e glândula sudorípara (C).

Fonte: Adaptado de Rastogi; Yadav (2012).

A penetração cutânea é influenciada por fatores relacionados à pele, à substância em questão e ao veículo (BARRET, 1969; LATHEESHJLAL et al., 2011). Com relação à pele, os fatores que podem alterar a penetração incluem as condições da pele (integridade e hidratação), idade, o fluxo sanguíneo, a região (espessura do estrato córneo) e o tamanho da

superfície de aplicação, metabolismo, temperatura e pH da pele, e as diferenças entre as espécies. Entre as características relacionadas à substância, temos o coeficiente de partição, peso molecular, coeficiente de difusão, estado de ionização e concentração no veículo (LATHEESHJLAL et al., 2011). O veículo pode aumentar a penetração de uma substância por promover contato íntimo com a superfície da pele, por ser miscível com a matriz lipídica do estrato córneo ou por provocar um efeito oclusivo, levando à hidratação do estrato córneo (BARRET, 1969).

A passagem de substâncias através da pele, ou de uma membrana, pode ser descrita pela lei de Fick, que determina o fluxo de permeação do fármaco, apresentada na Equação 1.

$$J = (K_m \cdot D_m) \cdot S \cdot C / e \quad \text{Equação 1}$$

onde: J: fluxo de absorção, ou quantidade de substância absorvida por unidade de superfície e tempo (g ou mol/cm<sup>2</sup>/h);

K<sub>m</sub>: coeficiente de partilha da substância;

D<sub>m</sub>: coeficiente de difusão da substância;

S: superfície de absorção (cm<sup>2</sup>);

C: concentração da substância (g ou mol/cm<sup>3</sup>);

e: espessura do estrato córneo.

A avaliação da retenção e permeação cutâneas pode ser realizada *in vitro*, por meio do uso de células de difusão. Essas células são constituídas por um compartimento doador e um receptor, separados por uma membrana, ou seja, a pele. Uma alíquota da formulação contendo a substância a ser avaliada é aplicada sobre a pele, no compartimento doador, e os analitos retidos e os que passam através da pele são quantificados, respectivamente, na pele e na solução receptora, presente no compartimento receptor. Entre as técnicas utilizadas na quantificação dos analitos estão a CLAE e a cromatografia gasosa. A membrana para esse estudo pode ser obtida a partir da pele de porco ou pele humana (SCCS, 2010).

No estudo de retenção e permeação cutâneas, utilizando células de difusão, o termo retenção ou penetração cutânea se refere à presença do analito no estrato córneo, na epiderme e/ou derme, enquanto que o termo permeação cutânea, se refere à presença do analito na solução receptora, e indica que houve passagem do analito através da pele (ROSSETI et al., 2010).

O estudo de penetração cutânea de filtros solares e de antioxidantes em formulações fotoprotetoras têm grande relevância no que diz respeito à eficácia e segurança dessas formulações, e constitui inclusive um dos testes necessários para caracterizar a segurança de produtos cosméticos (BRASIL, 2012a).

As recomendações quanto à retenção cutânea para garantir a eficácia dos filtros solares e antioxidantes em são contrárias. Segundo Mavon et al. (2007) e Yang et al. (2008), os filtros solares devem permanecer na superfície da pele ou no estrato córneo para que sejam eficazes. Assim, tais moléculas podem exercer seus efeitos protetores na superfície da pele e no estrato córneo, sendo que sua eficácia não está necessariamente relacionada à sua penetração nas camadas mais profundas desse órgão. Em contrapartida, os antioxidantes devem ser capazes de penetrar até a epiderme e derme para oferecer proteção satisfatória contra a radiação UV, uma vez que os raios UVA, os quais são responsáveis pela geração excessiva de EROS, penetram profundamente a pele (SAIJA et al., 2000).

### ***3. Objetivos***



### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a fotoestabilidade e a penetração cutânea de diferentes associações de filtros solares, *trans*-resveratrol e beta-caroteno em formulações fotoprotetoras.

### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações fotoprotetoras com FPS 30 contendo diferentes associações dos filtros solares avobenzona, metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, octiltriazone e bemotrizinol, e dos antioxidantes *trans*-resveratrol e beta-caroteno;
- Desenvolver e padronizar um método de CLAE que permita identificar e quantificar simultaneamente os filtros solares e os antioxidantes em estudo;
- Avaliar a fotoestabilidade dos filtros solares e dos antioxidantes presentes nas formulações em estudo por meio de CLAE;
- Avaliar a fotoestabilidade das formulações em estudo por meio da determinação da razão UVA/UVB por espectrofotometria;
- Avaliar a penetração cutânea dos filtros solares e dos antioxidantes presentes nas formulações contendo a associação de filtros solares mais fotoestável por meio do uso de células de Franz e de CLAE.

## ***4. Materiais e Métodos***

## 4.1. Materiais

### 4.1.1. Matérias-primas e reagentes

Algumas das matérias-primas utilizadas estão descritas de acordo com a nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) e com a denominação comum internacional ou INN (*International Non-proprietary Name*) disponibilizada pela Comissão das Comunidades Europeias (2006) e, quando necessário, também estão descritos seu nome comercial e fornecedor.

- Ácido Acético Glacial, PA, Synth;
- Água destilada e deionizada;
- Albumina soro bovina (BSA), código A7906, Sigma;
- Álcool etílico;
- Álcool isopropílico, grau HPLC;
- Álcool isopropílico, PA, Synth;
- Álcool metílico, grau HPLC;
- Alquil benzoato C12-15 (nomenclatura INCI: C12-15 ALKYL BENZOATE) – Crodamol<sup>TM</sup> AB, Croda;
- Avobenzona (nomenclatura INCI: BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; denominação INN: avobenzona) – Parsol® 1789, DSM;
- Base autoemulsificante A: álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico (nomenclatura INCI: CETEARYL ALCOHOL AND CETEARYL GLUCOSIDE) – Montanov 68®, Chemyunion;
- Base autoemulsificante B: álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato cetet-10 (nomenclatura INCI: CETEARYL ALCOHOL, DICETYL PHOSPHATE E CETETH-10 PHOSPHATE) – Crodafos CES®, Croda;
- Base autoemulsificante C: triglicerídeos do ácido caprílico/cáprico, estearato de glicol, PEG-3 cocoato de glicerila e estearato-7 (nomenclatura INCI: CAPRIC/CAPRYLIC TRIGLYCERIDES AND GLYCOL STEARATE AND PEG-3 GLYCERYL COCOATE AND STEARETH-7) – MixXinMe®, Croda;
- Base autoemulsificante D: pentaestearato de poliglicerila-10 e estearoil lactilato de sódio (nomenclatura INCI: BEHENYL ALCOHOL, POLYGLYCERYL-10

PENTASTEARATE, SODIUM STEAROYL LACTYLATE) – Nikkomulse 41® , Nikko Chemicals;

- Bemotrizinol (nomenclatura INCI: BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE) – Tinosorb® S, BASF;
- Beta-caroteno (nomenclatura INCI: CAROTENE) -  $\beta$ -Carotene 30% FS, DSM, Suíça;
- BHT (denominação INN: Butil-hidroxitolueno);
- *Blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e emulsificantes contendo hidroxietil acrilato e copolímero de acriloidimetiltaurato de sódio, esqualeno, polissorbato 60 – Simulgel NS®, Chemyunion.
- *Blend* de emolientes e silicone contendo miristato de poliglicerila, difenil dimeticona, trietilexanoína e glicerina – Net FS®, Nikko Chemicals;
- Ciclometicone volátil – DC 245, Croda;
- Estearato de etil-hexila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL STEARATE) – Cetiol® 868, Cognis;
- Fenoxietanol e parabenos (nomeclatura INCI: PHENOXYETHANOL (AND) METHYLPARABEN (AND) ETHYLPARABEN (AND) PROPYLPARABEN (AND) BUTYLPARABEN) – Phenova, Mapric;
- Fosfato de potássio monobásico, PA, Synth;
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado, PA, Synth;
- Glicerina, PA, Synth;
- Metoxicinamato de etil-hexila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE) – Parsol® MCX, DSM;
- Octiltriazona (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL TRIAZONE) – Uvinul® T 150, BASF;
- Octocrileno (nomenclatura INCI: OCTOCRYLENE, denominação INN: octocrileno) – Neo Heliopan® 303, Symrise;
- Olet-3 (nomenclatura INCI: OLETH-3) – Brij™ O3, Croda;
- Polissorbato 80 (nomenclatura INCI: POLYSORBATE-80) – Tween 80, Synth;
- Propilenoglicol, PA, Synth;
- Tetrahidrofurano, PA, F. Maia;
- *Trans*-resveratrol (nomenclatura INCI: RESVERATROL) - Regu®-Fade, DSM, Suíça.

#### 4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador Fisatom 713D;
- Balança analítica Shimadzu AY220;
- Balança analítica Shimadzu AUW220D;
- Células de difusão vertical de Franz com área de difusão de  $1.77\text{cm}^2$  e reservatório de volume fixo de 7mL, acopladas a coletor automático, Hanson Instruments, Chatsworth, CA;
- Centrífuga Heraeus Megafuge 16R;
- Centrífuga FANEM 206 MP;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250mm,  $5\mu\text{m}$ );
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, Shimadzu;
- Dermatômetro Dermatome 75 mm, NOUVAG AG;
- Espectrofotômetro Agilent 8453;
- Espectrofotômetro FENTO – 800 XI;
- Estufa com termostato e controle de umidade Olidef CZ;
- Filtros com membrana em politetrafluoretileno (PTFE), com  $0,45\mu\text{m}$  de porosidade e 13 mm de diâmetro, Millipore;
- Fita adesiva Durex® Celofane, 3M;
- Homogeneizador de tecidos tipo Turrax, MARCON 102;
- Lâminas de dermatômetro 75 mm, NOUVAG AG;
- Lâmpadas Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven, Netherlands);
- Papel de filtro 15 cm de diâmetro e  $28\mu\text{m}$  de porosidade, Quanty;
- Peagômetro MS Tecnopan modelo mPA-210;
- Pinças cirúrgicas;
- Pipetas automáticas;
- Pipetas de Pasteur;
- Radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Valle, França) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA;
- Sonicador Ultrasonic Clean Ultra Cleaner 750;
- Tesoura cirúrgica;
- Tubos de 2 mL, Eppendorf;

- Tubos Falcon de 15 e de 50 mL;
- Vidrarias em geral;
- Vórtex IKA MS2 Minishaker.

#### 4.1.3. Pele

Peles de orelhas de porcos obtidas do abatedouro Olhos d'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Elaboração das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade

Foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras com FPS 30 (estimado) à base dos filtros solares: avobenzona, metoxicinamato de etil-hexila, octocrileno, octiltriazone e bemotrizinol. Para a determinação das concentrações das associações dos filtros solares empregadas nas formulações fotoprotetoras, foi utilizado o programa *BASF Sunscreen Simulator* (2011), por meio do qual foram determinadas três diferentes associações de filtros solares com FPS estimado em 30 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Associações de filtros solares.

Filtro solar	% p/p		
	Associação 1	Associação 2	Associação 3
Avobenzona	4,00	4,00	4,00
Metoxicinamato de etil-hexila	8,00	8,00	8,00
Octocrileno	6,00	6,00	6,00
Bemotrizinol	-	2,00	-
Octiltriazone	-	-	2,00

As associações de filtros solares 2 e 3 foram elaboradas com quatro diferentes bases autoemulsificantes: base A (Montanov 68®), contendo álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico; base B (Crodafos CES®), contendo álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato cetet-10; base C (MixXinMe®), contendo triglicerídeos do ácido caprílico / cáprico, estearato de glicol, PEG-3 cocoato de glicerila e estearato-7; e base D (Nikkomulse 41®), contendo pentaestearato de poliglicerila-10, estearoil lactilato de sódio. Foram ainda utilizados os emolientes estearato de etil-hexila e alquil benzoato C12-15, bem como propilenoglicol, glicerina, água, fenoxietanol e parabenos, BHT, ciclometicone, um *blend* de emolientes e

silicone (miristato de poliglicerila, difenil dimeticona, trietilexanoína e glicerina – Net FS®) e um *blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e emulsificantes (hidroxietil acrilato e copolímero de acrilóildimetiltaurato de sódio, esqualeno e polissorbato 60 – Simulgel NS®).

Assim, inicialmente foram preparadas oito diferentes formulações com as duas associações que apresentavam todos os filtros solares em estudo, ou seja, as associações 2 e 3. Cada associação de filtros solares foi elaborada com as bases autoemulsificantes mencionadas acima, conforme apresentado na Tabela 3. As formulações (F2A, F2B, F2C, F2D, F3A, F3B, F3C, F3D) foram acrescidas ou não de 1 % de *trans*-resveratrol e de 2% de beta-caroteno (solução a 30%), com o intuito de definir qual a formulação mais estável frente aos testes preliminares de estabilidade, descritos no item 4.2.2., bem como avaliar a influência dessas matérias-primas na estabilidade das associações dos filtros solares em estudo.

**Tabela 3** – Composição das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade.

Substância	% p/p							
	Associação 2				Associação 3			
	F2A	F2B	F2C	F2D	F3A	F3B	F3C	F3D
Hidroxiethyl acrilato e copolímero de acriloidimetil-taurato de sódio, esqualeno e polissorbato 60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Miristato de poliglicerila, difenil dimeticona, trietil-exanoína	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Estearato de etilexila	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
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
Base autoemulsificante A	3,00	-	-	-	3,00	-	-	-
Base autoemulsificante B	-	3,00	-	-	-	3,00	-	-
Base autoemulsificante C	-	-	3,00	-	-	-	3,00	-
Base autoemulsificante D	-	-	-	3,00	-	-	-	3,00
Alquil Benzoato C12-15	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Avobenzona	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Metoxicinamato de etilhexila	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Octocrileno	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Bemotrizinol	2,00	2,00	2,00	2,00	-	-	-	-
Octiltriazona	-	-	-	-	2,00	2,00	2,00	2,00
Água q.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

As formulações contendo a base autoemulsificante A foram consideradas as mais estáveis nos testes preliminares de estabilidade, sendo esta base selecionada para estudo de fotoestabilidade descrito no item 4.2.3. Assim, foram elaboradas formulações contendo apenas as 3 associações de filtros solares em estudo (F1F, F2F e F3F), bem como formulações acrescidas de *trans*-resveratrol (F1R, F2R e F3R), de beta-caroteno (F1B, F2B e F3B) e da associação desses antioxidantes (F1RB, F2RB e F3RB), conforme apresentado na Tabela 4, para definir qual a associação de filtros solares / antioxidantes mais fotoestável.



**Tabela 4** – Composição das formulações submetidas ao estudo de fotoestabilidade

Substância	% p/p											
	Associação 1				Associação 2				Associação 3			
	F1F	F1R	F1B	F1RB	F2F	F2R	F2B	F2RB	F3F	F3R	F3B	F3RB
Hidroxietil acrilato e copolímero de acrilóildimetil-taurato de sódio, esqua-leno e polissorbato 60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Miristato de poliglicerila, difenil dimeticona, trietil-exanoína	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Estearato de etilexila	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80	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	0,05	0,05	0,05	0,05
Álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Alquil Benzoato C12-15	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Avobenzona	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Metoxicinamato de etil-hexila	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Octocrileno	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Bemotrizinol	-	-	-	-	2,00	2,00	2,00	2,00	-	-	-	-
Octiltriazona	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>Trans</i> -resveratrol	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00
Beta caroteno	-	-	2,00	2,00	-	-	2,00	2,00	-	-	2,00	2,00
Água q.s.p.	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

#### 4.2.2. Testes preliminares de estabilidade

As formulações apresentadas na Tabela 3 foram submetidas a testes preliminares de estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual diária durante 15 dias quando mantidas no ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 45°C, para a determinação da melhor formulação para veiculação dos filtros solares. No teste de centrifugação, 5 gramas de cada amostra objeto de estudo foram centrifugados a 3000 rpm (985g) por 30 minutos, em centrífuga Heraeus Megafuge 16R. A medida de pH das

formulações em estudo foi realizada por meio de amostras diluídas em água destilada (1%) utilizando peagômetro MS Tecnopan modelo mPA-210. As medidas foram realizadas no tempo zero. Na avaliação visual, foram consideradas, após prévio estoque no ambiente e a 45°C, as seguintes alterações: cor, separação de fases, homogeneidade e consistência (BRASIL, 2004).

#### **4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares, dos antioxidantes e das formulações**

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para as formulações apresentadas na Tabela 4. As formulações, contendo as diferentes associações de filtros solares, e acrescidas de *trans*-resveratrol e beta-caroteno, isoladamente ou em combinação, foram submetidas ao estudo de fotoestabilidade por meio da determinação da concentração remanescente dos filtros solares e dos antioxidantes em estudo presentes nas formulações irradiadas e não irradiadas, utilizando CLAE, e por meio da determinação da razão UVA/UVB das formulações irradiadas e não irradiadas, utilizando espectrofotometria no UV.

##### **4.2.3.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo**

Foram aplicadas 40mg das formulações em lâminas de vidro que, após 15 minutos, foram expostas a uma dose de 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA (DAMIANI et al., 2010; DAMIANI et al., 2007), na faixa de 320 a 400nm, durante 115 minutos, emitida por quatro lâmpadas Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven, Netherlands). Em relação à radiação UV proveniente do sol, a dose de 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA equivale a 270 minutos de exposição à radiação UVA solar, de intensidade igual a 17 w/m<sup>2</sup>, a qual foi medida às 12 horas do dia 18 de maio de 2011 na cidade de Ribeirão Preto. Neste dia o céu estava claro e sem a presença de nuvens. Para cada lâmina submetida à irradiação havia um controle negativo, ou seja, uma lâmina deixada ao abrigo da luz (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). As lâminas (controle e expostas à radiação UVA) foram imersas em aproximadamente 20 mL de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) para a dissolução do filme seco em ultra-som. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro (45 µm) e transferida para balão volumétrico de 25 mL, e o volume completado com tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) (BERSET et al., 1996; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; LUTEROTTI; FRANKO; BICANIC,1999). A solução final foi acondicionada em frasco de vidro âmbar e armazenada em freezer.

#### 4.2.3.2. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após realização do procedimento de extração descrito no item 4.2.3.1, as soluções resultantes foram concentradas 3 vezes e ressuspensas em 500µl de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70). As soluções concentradas foram analisadas por CLAE em cromatógrafo da marca Shimadzu acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, em coluna de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250mm, 5µm) com modo de eluição gradiente.

As condições cromatográficas utilizadas nas análises estão descritas a seguir:

- Fase móvel (eluição por gradiente): eluição inicial constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (6:14:80) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (21:49:30) por 18,5 minutos, seguida por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (30:70:0) por 23 minutos.
- Fluxo de fase móvel: 0,8mL.min<sup>-1</sup>.
- Volume de injeção: 20 µl.
- Comprimento de onda: 325 nm (filtros solares e *trans*-resveratrol) e 454 nm (beta-caroteno).
- Tempo de corrida: 60 minutos.
- Temperatura: ambiente.

O método de CLAE foi padronizado com base nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra- e inter-ensaio.

A fotoestabilidade das substâncias nas formulações apresentadas na Tabela 4 foi avaliada com base na porcentagem remanescente de cada substância após irradiação por UVA. A porcentagem remanescente de uma substância consiste na relação entre a sua concentração na formulação irradiada (remanescente) e a sua concentração na formulação não irradiada (total) multiplicada por um fator de 100.

##### 4.2.3.2.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico está relacionada à sua capacidade de selecionar e separar o analito na presença de outras substâncias (BRASIL, 2003).

A seletividade foi avaliada por meio da análise dos cromatogramas obtidos após injeção de soluções de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) contendo as substâncias em estudo, separadamente e em associação, nas concentrações 100µg/mL (filtros solares e *trans*-resveratrol) e 50µg/mL (beta-caroteno). Para a pesquisa de picos interferentes, os solventes utilizados no estudo de fotoestabilidade e o veículo das formulações foram analisados.

#### 4.2.3.2.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito analisado em um intervalo determinado (BRASIL, 2003).

A linearidade foi avaliada com base nos valores do coeficiente de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas de cada substância (BRASIL, 2003). Para construção das curvas foram utilizadas diluições preparadas em triplicata a partir de uma solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) contendo as substâncias em estudo nas seguintes concentrações: 400 (filtros solares), 100 (*trans*-resveratrol) e 50µg.mL<sup>-1</sup> (beta-caroteno). Os valores de área obtidos foram correlacionados com as concentrações conhecidas de cada substância e, a partir disso, foram obtidos as equações da reta e os coeficientes de correlação.

Curva do *trans*-resveratrol: soluções de concentração igual a 6,25; 12,50; 25; 50 e 75µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva do octocrileno: soluções de concentrações iguais a 25; 50; 100; 200 e 300 µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva do metoxicinamato de etil-hexila: soluções de concentrações iguais a 50; 100; 200; 300 e 400µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva da avobenzona: soluções de concentrações iguais a 25; 50; 100; 200 e 300µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva da octiltriazone: soluções de concentrações iguais a 12,50; 25; 50; 100 e 200µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva do beta-caroteno: soluções de concentrações iguais a 6,25; 12,50; 25; 37,50 e 50µg.mL<sup>-1</sup>.

Curva do bemotrizinol: soluções de concentrações iguais a 12,50; 25; 50; 100 e 200µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.2.3. Precisão e exatidão

A precisão de um método analítico representa a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de múltiplas análises de uma mesma amostra. Este parâmetro pode ser expresso como coeficiente de variação entre as medidas obtidas, o qual pode ser calculado de acordo com a equação abaixo (BRASIL, 2003):

$$CV = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Equação 2

onde,  $CV$  é o Coeficiente de Variação;  $S$  é o Desvio Padrão; e  $X$  é a média das concentrações.

A exatidão é um parâmetro que exprime a proximidade entre o valor determinado experimentalmente (obtido) e o valor teórico correspondente (real).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A exatidão pode ser avaliada com base na recuperação, que reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 1999). Assim, exatidão/recuperação do método analítico pode ser calculada por meio da seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$E = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100$$

Equação 3

Onde,  $E$  é a exatidão.

Para avaliar a precisão e a exatidão/recuperação do método foram utilizadas amostras não irradiadas das formulações F2RB e F3RB, que continham todas as substâncias em estudo, preparadas conforme procedimento descrito nos itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2.

Para a determinação da precisão e da exatidão/recuperação intra-ensaios, foram avaliadas amostras das formulações F2RB e F3RB, analisadas em sextuplicata em um mesmo dia. Para a determinação da precisão e da exatidão/recuperação inter-ensaios, foram avaliadas amostras dessas mesmas formulações, analisadas em triplicata, em 3 dias consecutivos.

Na avaliação da precisão e da exatidão intra e inter-ensaios, as concentrações das substâncias nas amostras, obtidas a partir das equações da reta das respectivas curvas

analíticas, foram utilizadas para o cálculo da variação (*CV*) entre as medidas e para o cálculo da exatidão/recuperação de acordo, respectivamente, com as equações 2 e 3.

#### **4.2.3.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV**

Após realização do procedimento de extração descrito no item 4.2.3.1, as soluções resultantes foram diluídas na proporção de 1:10 e analisadas em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 290 a 400 nm. O espectro de absorção e a área sob a curva (integral do espectro de absorção) das amostras, na faixa da radiação UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm), foram determinados, e a razão entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA/UVB foi então obtida (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

#### **4.2.3.4. Análise estatística**

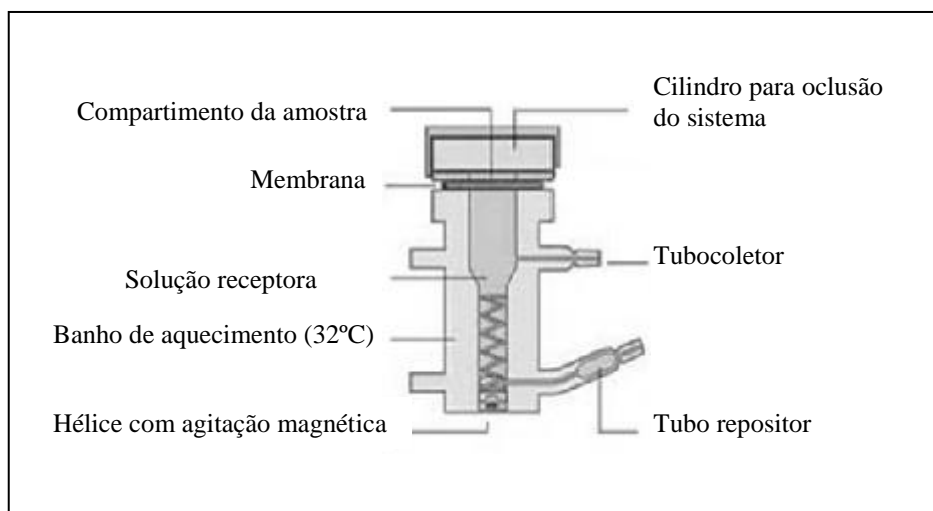
Os valores de razão UVA/UVB e de concentração dos filtros solares e dos antioxidantes, presentes nas formulações irradiadas e não irradiadas, bem como os valores de porcentagem remanescente das substâncias em estudo, foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, já que os dados experimentais da maioria das substâncias apresentou distribuição não normal.

#### **4.2.4. Estudo de penetração cutânea *in vitro* dos filtros solares e antioxidantes**

A metodologia utilizada neste estudo foi baseada nas recomendações do *Scientific Commitee on Consumer Safety* (SCCS, 2010).

Os experimentos de penetração cutânea *in vitro* (n=6) foram realizados em células de difusão vertical de Franz (com área de difusão de 1.77cm<sup>2</sup>), acopladas a coletor automático (Hanson Instruments, Chatsworth, CA). Neste tipo de célula, uma membrana é mantida horizontalmente sobre o compartimento inferior, que possui um reservatório de volume fixo (7 mL), e, sobre essa membrana, a área de difusão (1.77 cm<sup>2</sup>) é delimitada pelo compartimento doador. O compartimento inferior é preenchido com a solução receptora (Figura 12). Os compartimentos superior e inferior são mantidos fixos através de uma presilha de metal. Um banho termostatizado de água circulante e constantemente agitado a 300 rpm permite aquecer o compartimento inferior a 32°C. A homogeneidade da solução receptora é assegurada pelo uso de uma barra magnética, uma vez que as células são posicionadas sobre uma plataforma de agitação.

Neste estudo, peles de orelhas de porcos, devidamente limpas, foram utilizadas como membrana de permeação (LOPES et al., 2010).



**Figura 12** –Representação esquemática da célula de difusão vertical de Franz. Fonte: Adaptado de Hanson Research. Disponível em: <http://www.hansonresearch.com>. Acesso em: 27 jun. 2013.

#### 4.2.4.1. Preparação da pele de orelha de porco

A pele de orelha de porco foi coletada após a morte do animal e fornecida pelo abatedouro Olhos d'Água Indústria e Comércio de Carnes Ltda. A pele foi transportada em isopor contendo gelo para assegurar sua conservação. A pele foi cuidadosamente dissecada com auxílio de um bisturi para remoção do tecido subcutâneo. As amostras de pele livres do tecido subcutâneo foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e utilizadas dentro do período de 30 dias. No dia do experimento de penetração, a pele foi descongelada e dermatomizada a uma espessura de  $500\ \mu\text{m}$  utilizando dermatômetro (Dermatome – NOUVAG, Switzerland) e em seguida foram colocadas nas células de Franz com a região da derme voltada para a solução receptora e o estrato córneo voltado para o compartimento superior.

#### 4.2.4.2. Determinação da solução receptora

A escolha da solução receptora para o estudo foi feita com base em alguns estudos da literatura (BRINON et al., 1999; FELTON; WILEY; GODWIN, 2002; HAYDEN et al., 2005; JIANG et al., 1996; POTARD et al., 1999; SIMEONI; SCALIA; BENSON, 2004; VICENTINI et al., 2009) para assegurar máxima solubilização das substâncias estudadas. Ao final do experimento, a quantidade do ativo encontrada na solução receptora não deve exceder 10% do seu nível de saturação (SCCS, 2010).

Desta forma, foram realizados ensaios preliminares de solubilidade para avaliar sete diferentes composições de solução receptora, conforme apresentado na Tabela 5. Nesses

ensaios, 2,5 mg de *trans*-resveratrol, 15 mg de octocrileno, 20 mg de metoxicinamato de etilhexila, 10 mg de avobenzona, 1,5 mg de beta-caroteno e 5 mg de bemotrizinol, quantidade que teoricamente estaria presente em 250 mg de formulação, foram pesados, isoladamente, em 7 béqueres diferentes. Em seguida, em cada béquer foram adicionados 7 mL da solução receptora a ser avaliada. Esta condição, além de mimetizar os futuros ensaios de penetração cutânea, ainda promoveu um sistema em excesso de ativo, o que possibilitou a determinação do coeficiente de solubilidade de cada ativo estudado.

Os testes foram realizados em duplicata. As soluções foram mantidas sob agitação constante a 300 rpm por 4 horas e meia. Após o período de agitação, foi realizada a quantificação da concentração das substâncias em estudo por espectrofotometria utilizando o Espectrofotômetro FENTO – 800 XI.

**Tabela 5** –Composição das soluções receptoras (S) utilizadas nos ensaios preliminares de solubilidade.

Solução receptora	Composição
S1	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M)
S2	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 10% de etanol
S3	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 30% de etanol
S4	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 4% de polissorbato 80
S5	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 10% propilenoglicol
S6	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 4% de soroalbumina bovina
S7	Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 2% de olet-3

A solução receptora composta por tampão fosfato pH 7.4 (0.1M) acrescido com 4% de soroalbumina bovina (BSA) forneceu maior solubilidade para todos os ativos estudados quando comparado com as demais soluções e, por isso, foi utilizada nos estudos de penetração cutânea. Após selecionar a solução receptora, foram realizados testes preliminares de penetração cutânea *in vitro*, utilizando células de Franz, a partir dos quais foi observado que não houve permeação cutânea dos ativos estudados.

#### 4.2.4.3. Aplicação das formulações e coleta da solução receptora

As formulações contendo a associação 2 de filtros solares (F2F, F2R, F2B e F2RB) foram as que apresentaram maior fotoestabilidade, sendo selecionadas para o estudo de penetração cutânea. Cerca de 250mg de cada formulação em estudo (fase doadora), foi



aplicado sobre a pele de orelha de porco ( $1.77\text{cm}^2$ ), evitando-se a formação de bolhas entre a formulação e a pele (THAKKER; CHERN, 2003). Os experimentos foram realizados a  $32^\circ\text{C}$  sob agitação constante a 300 rpm (DAL BELO et al., 2009; POTARD et al, 1999).

O experimento teve duração de 12 horas (CASAGRANDE et al, 2007; VICENTINI et al., 2009). Ao final desse período, amostras de 1,2 mL foram coletadas e transferidas para tubos de 15 mL de capacidade e, em seguida, foram adicionados 4,8 mL de acetonitrila para provocar a precipitação da albumina. Os tubos foram levados à centrifugação por 30 minutos a 3000 rpm em centrífuga FANEM 206 MP (JIANG et al., 1996; SIMEONI; SCALIA; BENSON, 2004). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon e o conteúdo foi seco sob ar comprimido e ressuspendido em 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70). As soluções concentradas foram filtradas em filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade e quantificadas por CLAE.

#### **4.2.4.4. Avaliação da retenção dos filtros solares e antioxidantes no estrato córneo por *tape stripping***

A técnica de *tape stripping* baseia-se na remoção progressiva do estrato córneo (EC) pela aplicação sequencial de fitas adesivas na área onde a formulação foi aplicada, seguida da extração das substâncias ativas retidas nas fitas e posterior determinação por método adequado.

Ao final do experimento de penetração (12 horas), o excesso de formulação presente na superfície da membrana foi delicadamente removido com auxílio de papel absorvente e, em seguida, as peles foram retiradas da célula de difusão. As peles foram fixadas em uma superfície lisa com o EC voltado para cima e presas com fitas adesivas de celofane, de forma a deixar exposta apenas a área de permeação. Na área exposta à difusão o EC foi retirado por meio da aplicação de fitas adesivas de celofane sobre esta área. Foram aplicadas 16 fitas adesivas sucessivamente, sendo que a primeira fita foi desprezada, por conter excesso de formulação. A quantidade de fitas a ser utilizada na técnica de *tape stripping* (16 fitas) foi padronizada com base na total remoção do EC, indicada pelo brilho na face exposta da pele (LOPES et al., 2010; VICENTINI et al., 2009).

As fitas foram colocadas em tubos falcon e, a seguir, foram adicionados 3 mL da solução extratora, composta por tetrahidrofurano:isopropanol (30:70). Os tubos com as fitas imersas na solução extratora foram agitados em vórtex por 2 minutos e deixados por 15 minutos em banho de ultra-som para a extração das substâncias em estudo. As fitas foram retiradas dos tubos com o auxílio de pinças e as soluções foram centrifugadas a 9000 rpm

(8867g) por 15 minutos em centrífuga Heraeus Megafuge 16R. Em seguida, alíquotas de 1,6 mL das soluções foram transferidas para outro tubo falcon e levadas ao ar comprimido até evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 400µL de solução extratora, filtrado em filtros de 0,45 µm de porosidade e analisado por CLAE.

#### **4.2.4.5. Avaliação da retenção dos filtros solares e antioxidantes na epiderme viável e derme**

Após a retirada do EC, como descrito anteriormente, a área de permeação foi recortada, picotada e os fragmentos de pele, ou seja, epiderme viável + derme (E+D) foram colocados em tubos falcon, aos quais foram adicionados 3 mL da solução extratora, composta por tetrahydrofurano:isopropanol (30:70). Os tubos com os fragmentos de E+D imersos na solução extratora foram agitados em homogeneizador de tecidos por 1 minuto e, logo após, em vórtex por 2 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados em banho de ultra-som por 15 minutos para romper as células e extrair as substâncias em estudo. A suspensão obtida foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm (985g) em centrífuga Heraeus Megafuge 16R. Após esse procedimento, alíquotas de 2,5 mL das soluções foram transferidas para outro tubo falcon e levadas ao ar comprimido até evaporação total do solvente. O conteúdo dos tubos foi ressuspensionado em 500 µL de solução extratora, filtrado em filtros de 0,45 µm de porosidade e analisado por CLAE.

#### **4.2.4.6. Determinação dos filtros solares e antioxidantes por CLAE**

As soluções concentradas obtidas nos itens 4.2.4.3 a 4.2.4.5 foram analisadas por CLAE em cromatógrafo da marca Shimadzu acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, em coluna de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250mm, 5µm) com modo de eluição gradiente. As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram as mesmas utilizadas no estudo de fotoestabilidade por CLAE, descritas no item 4.2.3.2.

Para o estudo de penetração cutânea foi necessário reavaliar a seletividade e a linearidade, e estabelecer o limite inferior de quantificação do método analítico por CLAE. Além disso, também foi realizada a avaliação da taxa de recuperação dos filtros solares e antioxidantes em estudo utilizando a pele como matriz biológica.

##### **4.2.4.6.1. Seletividade: Pesquisa de interferentes**

A seletividade analítica do método para as substâncias em estudo já havia sido avaliada. Portanto, nesta etapa, foi realizada a avaliação da seletividade bioanalítica por meio

da pesquisa de picos interferentes. Para tal, foram analisadas soluções receptoras, ressuspendidas em tetrahydrofurano:isopropanol (30:70), e soluções extratoras contendo: fragmentos de E+D; fita adesiva sem o EC (15 fitas); e fita adesiva com o EC (15 fitas).

#### 4.2.4.6.2. Linearidade

Para construção das curvas analíticas, foram utilizadas diluições preparadas em triplicata a partir de uma solução contendo as substâncias em estudo nas seguintes concentrações: 400 (filtros solares), 100 (*trans*-resveratrol) e  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  (beta-caroteno). Os valores de área obtidos foram correlacionados com as concentrações conhecidas de cada substância utilizada e, a partir disso, foram obtidos as equações da reta e os coeficientes de correlação.

Curva do *trans*-resveratrol: soluções de concentrações iguais a 0,781; 1,560; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e  $75\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Curva do octocrileno: soluções de concentrações iguais a 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e  $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Curva do metoxicinamato de etil-hexila: soluções de concentrações iguais a 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 300 e  $400\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Curva da avobenzona: soluções de concentrações iguais a 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e  $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Curva do beta-caroteno: soluções de concentrações iguais a 0,781; 1,560; 3,125; 6,25; 12,50 e  $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Curva do bemotrizinol: soluções de concentrações iguais a 1,560; 3,125; 6,25; 12,50; 25; 50 e  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 4.2.4.6.3. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

Foram preparadas diluições em triplicata com um fator de diluição constante (2.0) para construção das curvas analíticas, a partir de uma solução contendo  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  das substâncias em estudo (*trans*-resveratrol, octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila, avobenzona, beta-caroteno e bemotrizinol). As curvas foram construídas com concentrações que variavam de 0,049 a  $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para determinar o LIQ, foram utilizados valores de concentração 5% menores do que os utilizados para construção das curvas analíticas dessas substâncias, ou seja,

foram analisadas soluções contendo as seguintes concentrações dos filtros solares e antioxidantes em estudo: 0,046; 0,093; 0,186; 0,371; 0,742; 1,48; 2,97; 5,94; 11,88 e 23,75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Para determinar o LIQ, foram considerados os critérios determinados pela FDA (FDA, 2001), onde se deve satisfazer duas condições: o LIQ deve apresentar valores de exatidão entre 80 e 120%, valores de precisão inferiores a 20%, e deve ser pelo menos 5 vezes maior que a resposta do branco (amostras de fluido receptor, E+D e EC).

#### 4.2.4.6.4. Recuperação dos filtros solares e antioxidantes

Para avaliar a recuperação (n=6) dos filtros solares e antioxidantes em estudo nas amostras de pele, o EC foi retirado de uma área de aproximadamente 1,77  $\text{cm}^2$  da pele utilizando 15 fitas adesivas, por meio da técnica de *tape stripping*, as quais foram colocadas em um tubo falcon. Após a remoção do EC, a E+D foi recortada, picotada e os fragmentos de pele foram colocados em outro tubo falcon. Aos tubos contendo EC e E+D foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de *trans-resveratrol*, 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila, avobenzona e bemotrizinol, e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de beta-caroteno. O solvente foi evaporado, e em seguida foram adicionados 3 mL da solução extratora, composta por tetrahydrofurano:isopropanol (30:70). A extração das substâncias presentes no tubo com EC e com E+D foi realizada conforme descrito nos itens 4.2.4.4. e 4.2.4.5., respectivamente. Para garantir a quantificação analítica das amostras, após realizar a extração, as soluções presentes no tubo com EC foram concentradas 4 vezes, e as amostras presentes no tubo com E+D foram concentradas 6 vezes. As soluções concentradas foram filtradas em filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade e analisadas por CLAE. A recuperação foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100$$

Equação 4

#### 4.2.4.7. Análise estatística

Os valores de concentração dos filtros solares e dos antioxidantes encontrados no EC e na E+D foram submetidos à análise estatística pelo teste de análise de variância (ANOVA), uma vez que os dados experimentais de todas as substâncias apresentaram distribuição normal.

## ***5. Resultados***

### 5.1. Testes preliminares de estabilidade

Após o teste de centrifugação foi observado que todas as formulações se mantiveram estáveis, pois não houve alteração do aspecto visual das mesmas e nem separação de fases.

O pH das formulações, contendo apenas filtros solares e filtros solares acrescido de *trans*-resveratrol e beta-caroteno, à base das diferentes ceras auto-emulsificantes avaliadas, ficou entre 5,86 e 6,65, conforme apresentado na Tabela 6.

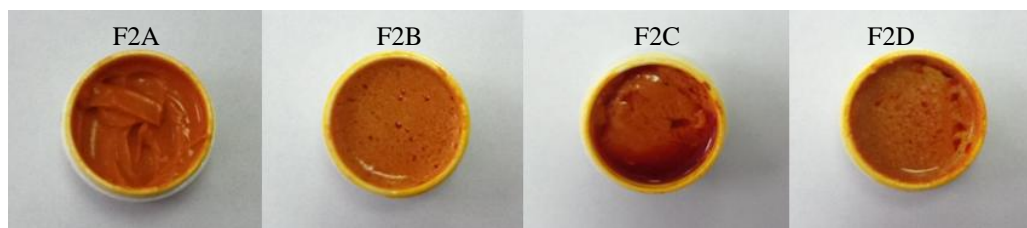
**Tabela 6** – Valores de pH das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade.

Formulação	pH	
	Filtros solares	Filtros solares acrescidos de <i>trans</i> -resveratrol e beta-caroteno
F <sub>2</sub> A	6,17	6,18
F <sub>2</sub> B	6,17	6,20
F <sub>2</sub> C	6,13	6,17
F <sub>2</sub> D	6,65	6,52
F <sub>3</sub> A	6,12	5,95
F <sub>3</sub> B	6,32	6,42
F <sub>3</sub> C	5,86	6,12
F <sub>3</sub> D	6,13	6,20

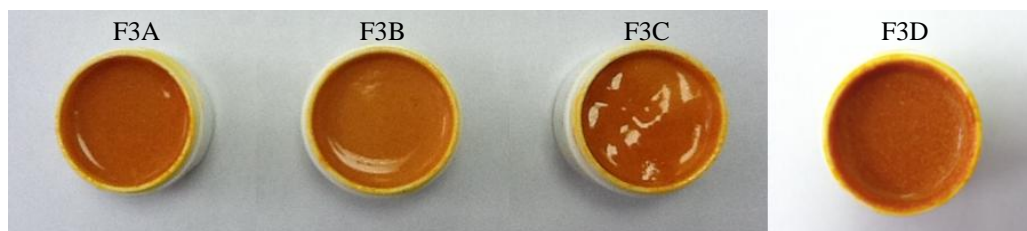
Após 15 dias de armazenamento no ambiente e a 45°C, as formulações que continham apenas os filtros solares não sofreram alterações quanto ao aspecto visual com relação à cor, à homogeneidade, separação de fases e consistência. No entanto, algumas formulações que continham os filtros solares associados ao *trans*-resveratrol e ao beta-caroteno sofreram alterações quanto ao aspecto visual com relação à cor, à homogeneidade (F<sub>2</sub>B, F<sub>2</sub>C, F<sub>2</sub>D e F<sub>3</sub>D), separação de fases (F<sub>2</sub>B, F<sub>2</sub>C e F<sub>2</sub>D) e consistência (F<sub>2</sub>B, F<sub>3</sub>B, F<sub>2</sub>C, F<sub>2</sub>D e F<sub>3</sub>D), quando armazenadas a 45°C (Figuras 13A e 13B).

Após 15 dias de armazenamento no ambiente e a 45°C, as formulações elaboradas com a base autoemulsificante A, contendo as duas associações de filtros solares (2 e 3) foram as que apresentaram a melhor homogeneidade e uniformidade após a incorporação do *trans*-resveratrol e beta-caroteno (Figuras 13A e 13B). Assim, tendo em vista os resultados obtidos após os testes de estabilidade preliminar das formulações estudadas, a base autoemulsificante A foi selecionada para os estudos subsequentes.

A)



B)



**Figura 13** – Formulações contendo as bases autoemulsificantes A, B, C e D acrescidas de *trans*-resveratrol e beta-caroteno após 15 dias de armazenamento a 45°C. **(A)**: formulações contendo a associação 2 de filtros solares. **(B)**: formulações contendo a associação 3 de filtros solares.

## 5.2. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares, dos antioxidantes e das formulações

### 5.2.1. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por CLAE

#### 5.2.1.1. Padronização do método de CLAE

Os estudos de padronização do método de CLAE foram realizados com o objetivo de obter um método que permitisse a análise simultânea do *trans*-resveratrol, do octocrileno, do metoxicinamato de etil-hexila, da avobenzona, da octiltriazona, do beta-caroteno e do bemotrizinol com seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis.

Para desenvolver o método de CLAE, diversas fases móveis com diferentes proporções de água acidificada com 2% de ácido acético, metanol e isopropanol, bem como diferentes gradientes, foram estudados.

Depois de avaliar os cromatogramas obtidos após várias análises por CLAE, o método que proporcionou a melhor resolução dos picos das 7 substâncias em estudo foi eluição por gradiente, iniciando com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (6:14:80) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético

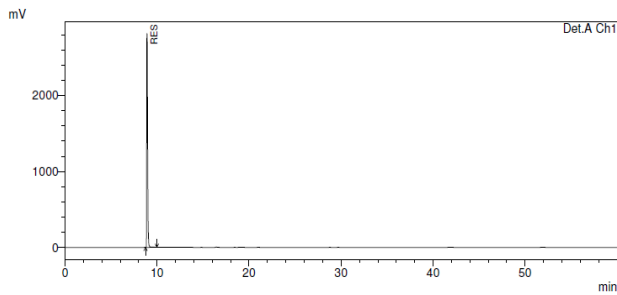
(21:49:30) por 18,5 minutos, seguida por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (30:70:0) por 23 minutos. Assim, esse foi o método cromatográfico utilizado nas análises dos filtros solares e antioxidantes estudados.

#### **5.2.1.1.1. Seletividade**

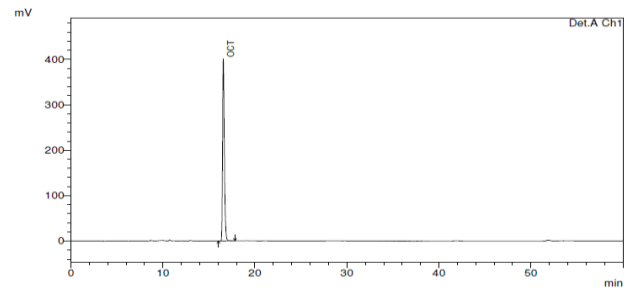
Os cromatogramas a seguir correspondem aos padrões de todas as substâncias analisadas, separadamente (Figura 14) e em uma mesma solução (Figura 15C), ao branco de reagente (Figura 15B), e ao veículo das formulações (Figura 15A). De acordo com esses cromatogramas, o método se mostrou seletivo para as substâncias analisadas, e não houve interferência dos solventes utilizados e nem do veículo das formulações.



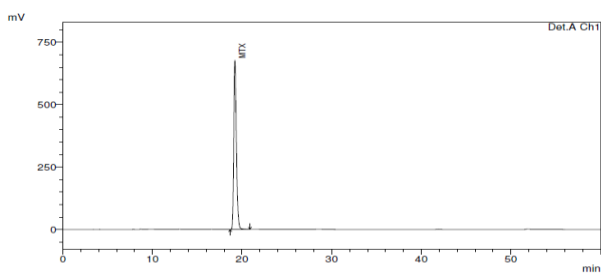
A)



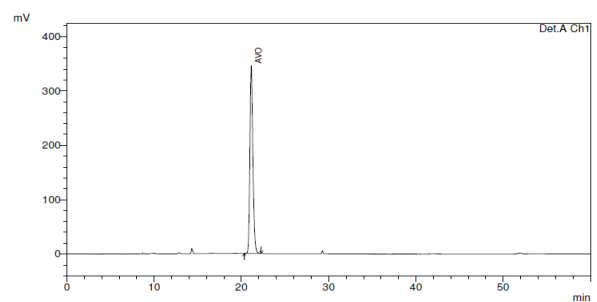
B)



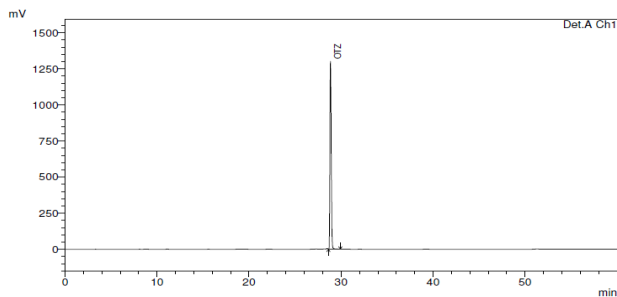
C)



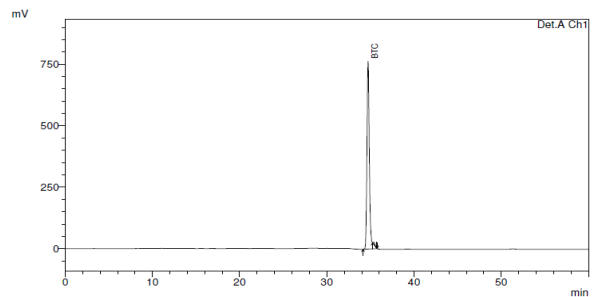
D)



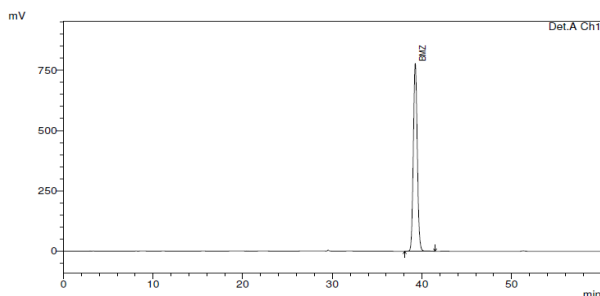
E)



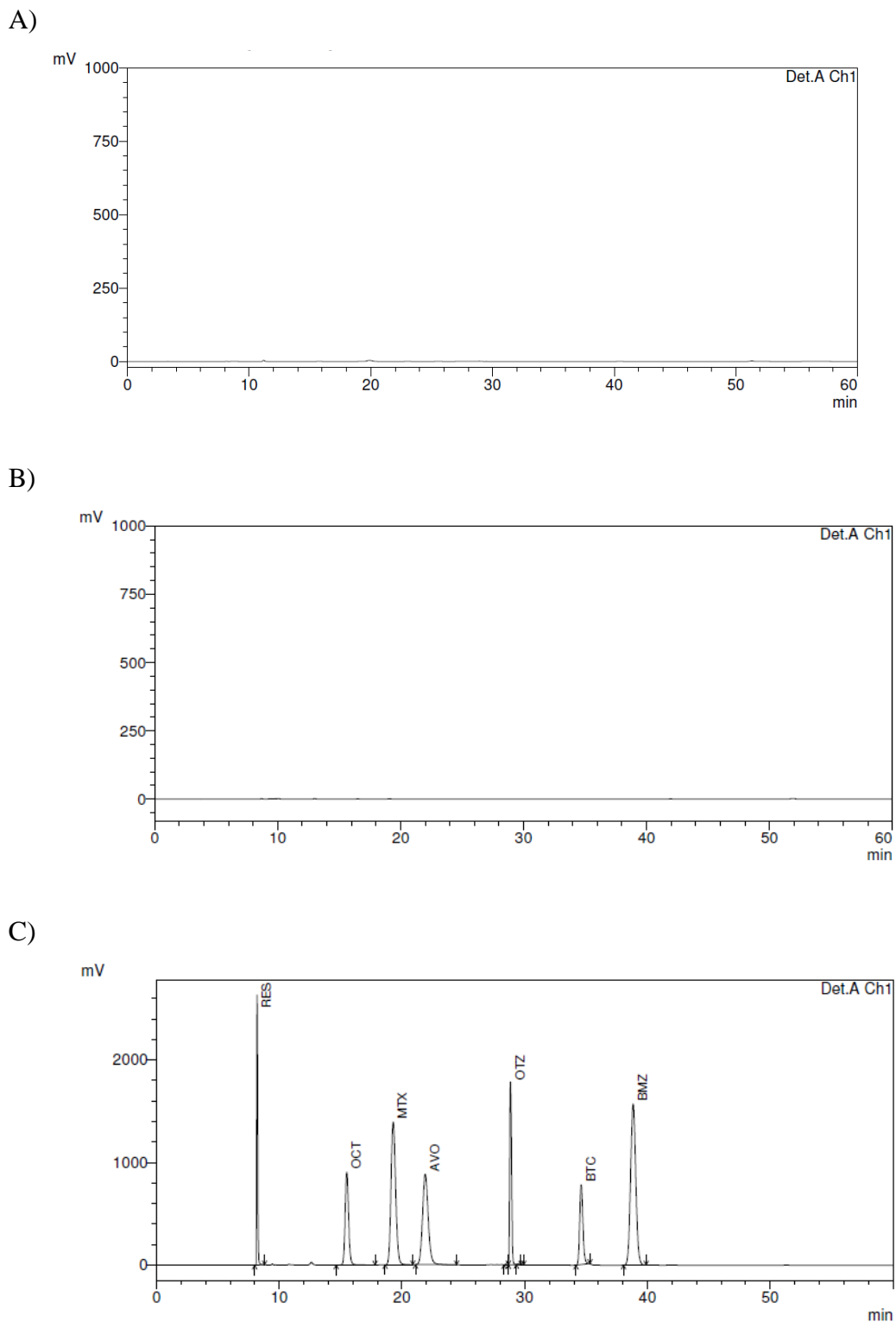
F)



G)



**Figura 14** – Perfil cromatográfico dos padrões das substâncias em estudo. **(A):** *Trans*-resveratrol (RES). **(B):** Octocrileno (OCT). **(C):** metoxicinamato de etil-hexila (MTX). **(D):** Avobenzona (AVO). **(E):** Octiltiazona (OTZ). **(F):** Beta-caroteno (BTC). **(G):** Bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo: 0.8 mL.min<sup>-1</sup>; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 (filtros solares e *trans*-resveratrol) e 454nm (beta-caroteno).

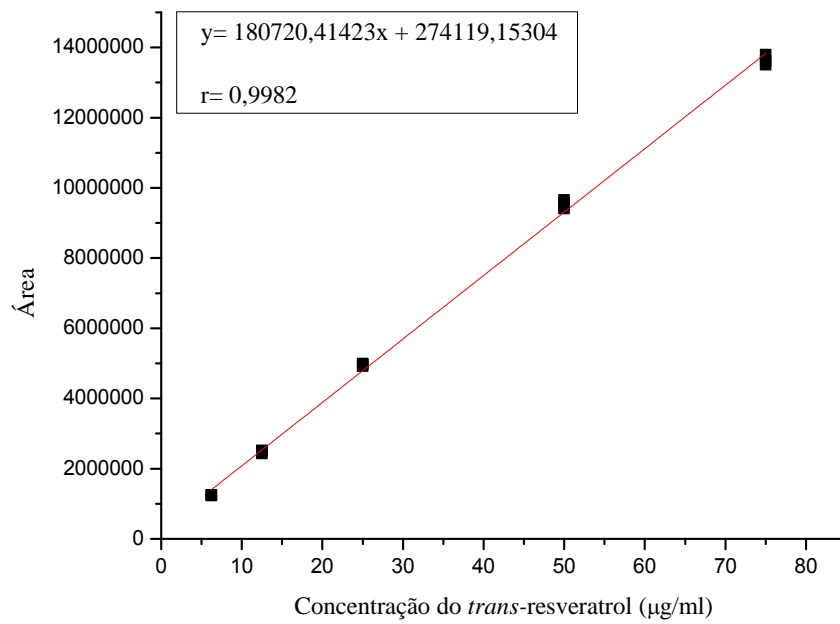


**Figura 15** – Perfil cromatográfico da extração do veículo (formulação sem nenhum filtros solar ou substância em estudo) (A), do branco de reagente, ou seja, tetrahydrofurano:isopropanol (30:70) (B), e dos filtros solares e antioxidantes em solução de tetrahydrofurano:isopropanol (30:70) (C). Picos: *Trans*-resveratrol (RES), Octocrileno (OCT), Metoxicinamato de etil-hexila (MTX), Avobenzona (AVO), Octiltriazone (OTZ), Beta-caroteno (BTC) e Bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 14.

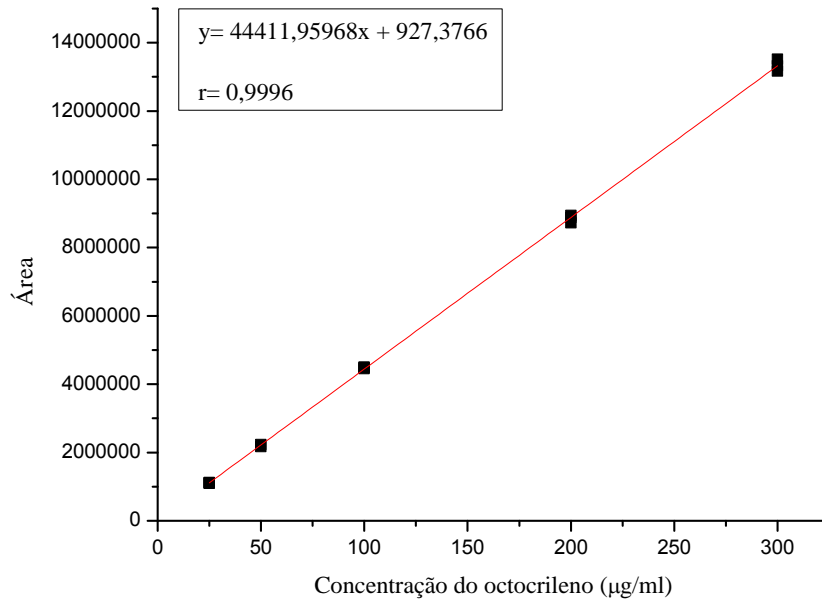
#### **5.2.1.1.2. Linearidade**

As curvas analíticas foram construídas a partir da análise dos dados obtidos por CLAE conforme descrito no item 4.2.3.2.2. Os gráficos de cada substância com suas respectivas equações da reta e coeficientes correlação ( $r$ ) estão apresentados a seguir (Figuras 16 a 19). Todas as substâncias apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99, o que nos permite afirmar que o método apresenta linearidade no intervalo de concentração avaliado (BRASIL, 2003).

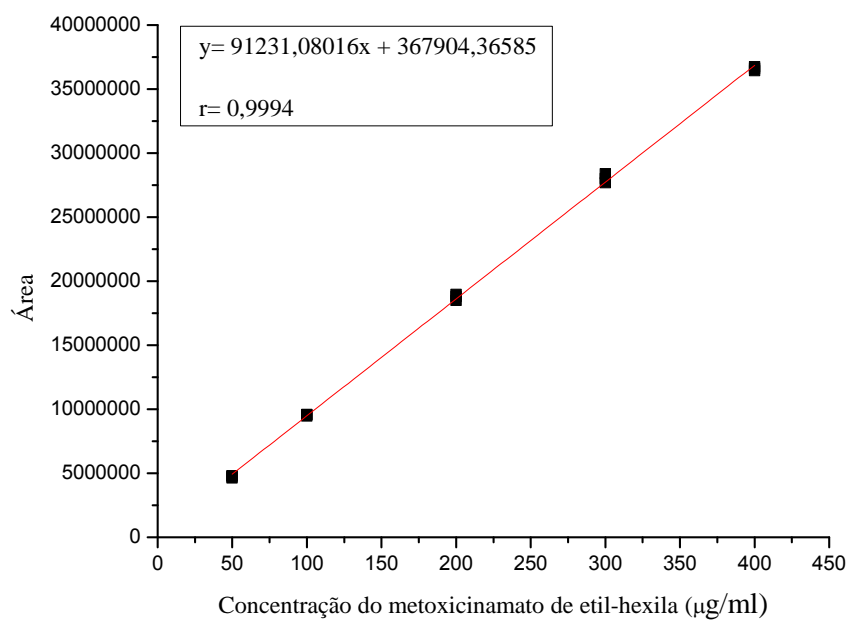
A)



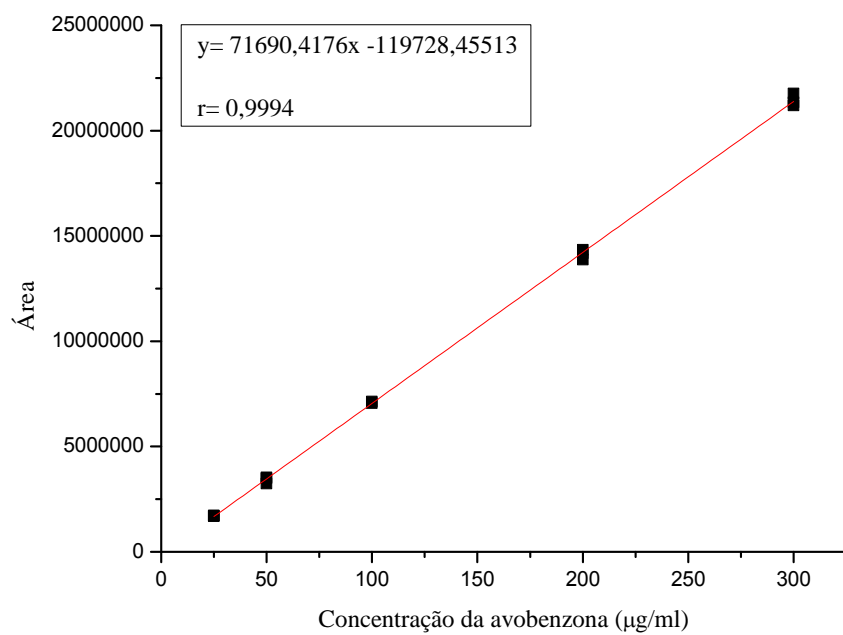
B)

**Figura 16** – Curvas analíticas do *trans*-resveratrol (A) e octocrileno (B).

A)

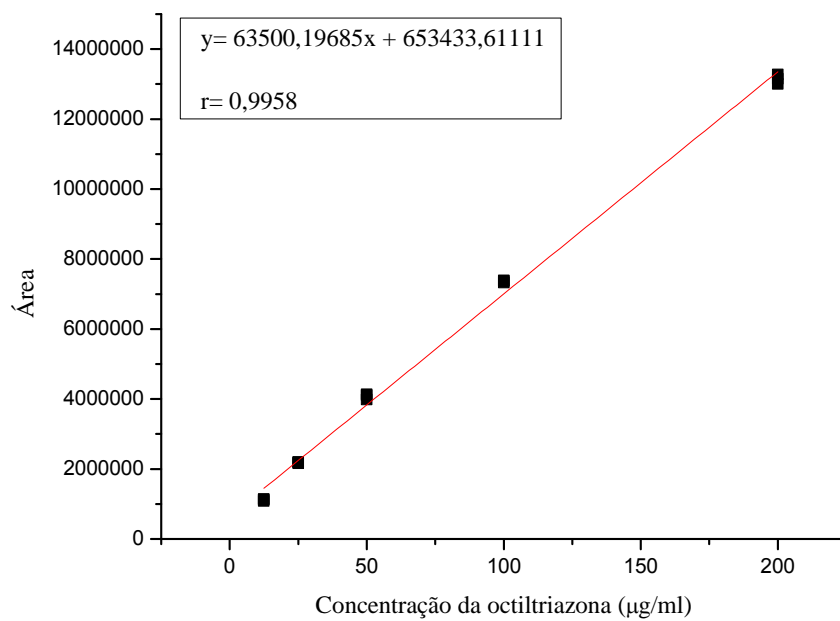


B)

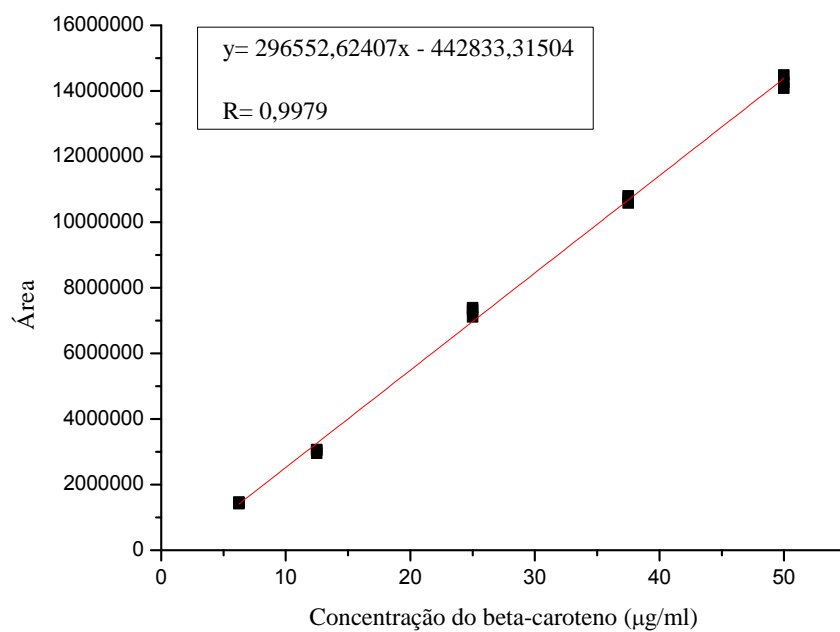


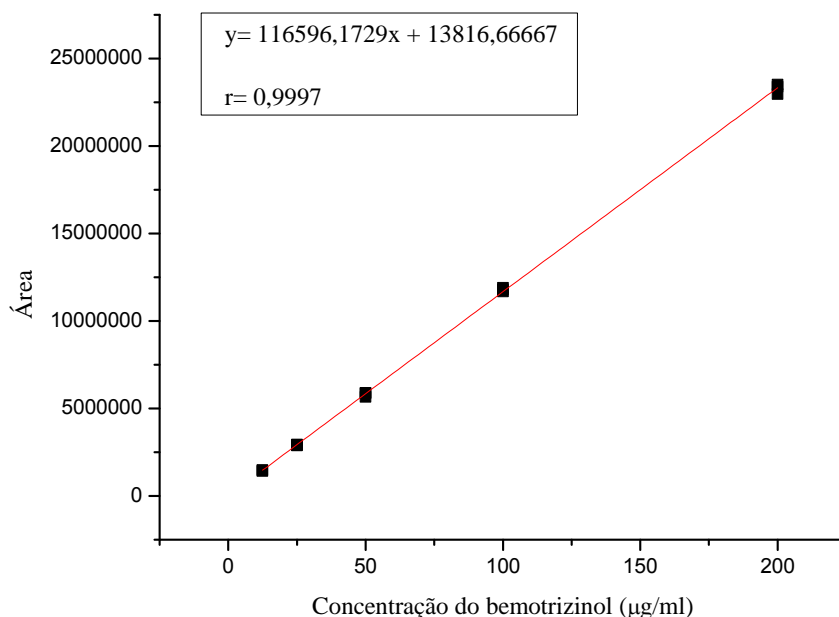
**Figura 17** – Curvas analíticas do metoxicinamato de etil-hexila (A) e da avobenzona (B).

A)



B)

**Figura 18** – Curvas analíticas da octitriazona(A) e do beta-caroteno (B).



**Figura 19** – Curva analítica do bemotrizinol.

### 5.2.1.1.3. Precisão e exatidão

Os valores de precisão intra e inter-ensaios e de exatidão/recuperação estão apresentados na Tabela 7. A partir desses valores, de acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos (BRASIL, 2003), o método pode ser considerado preciso e exato.

**Tabela 7** – Precisão e exatidão intra e inter-ensaio das formulações F2RB e F3RB. RES: *Trans*-resveratrol; OCT: Octocrileno; MTX: Metoxicinamato de etil-hexila; AVO: Avobenzona; OTZ: Octiltriazona; BTC: Beta-caroteno; BMZ: Bemotrizinol.

Padrão	Formulação	Precisão e exatidão intra-ensaio (n=6)				Precisão e exatidão inter-ensaio (n=12)		
		Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração obtida ± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão/Recuperação	Concentração obtida ± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão/Recuperação
RES	F2RB	16	15,36 ± 0,31	2,0	96,0	15,22 ± 0,36	2,4	95,1
	F3RB		15,54 ± 0,54	3,5	97,1	15,61 ± 0,58	3,7	97,6
OCT	F2RB	96	101,90 ± 2,68	2,6	106,2	100,50 ± 2,84	2,8	104,7
	F3RB		100,25 ± 3,56	3,6	104,4	101,40 ± 3,41	3,4	105,6
MTX	F2RB	128	134,60 ± 3,45	2,6	105,2	133,34 ± 3,38	2,5	104,2
	F3RB		132,90 ± 4,61	3,5	103,8	134,35 ± 4,46	3,4	105,0
AVO	F2RB	64	64,33 ± 1,91	3,0	100,5	64,93 ± 1,81	2,8	101,5
	F3RB		63,93 ± 2,27	3,6	99,9	65,83 ± 2,94	4,5	102,9
OTZ	F3RB	32	34,90 ± 0,31	3,0	109,1	35,37 ± 1,14	3,2	110,5
BTC	F2RB	9,6	10,48 ± 0,31	2,9	109,2	10,14 ± 0,50	4,9	105,6
	F3RB		10,33 ± 0,34	3,3	107,6	10,13 ± 0,43	4,2	105,5
BMZ	F2RB	32	34,00 ± 0,84	2,5	106,3	33,53 ± 0,93	2,8	104,8

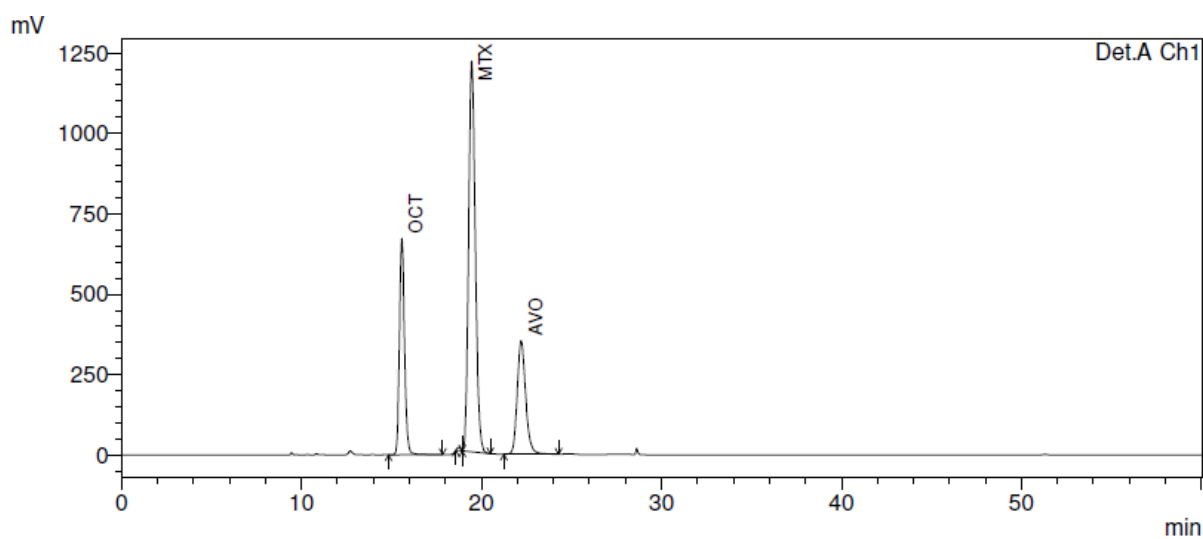
### **5.2.1.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e antioxidantes por CLAE**

As Figuras 20 a 31 representam os cromatogramas das formulações em estudo, submetidas ou não à irradiação.

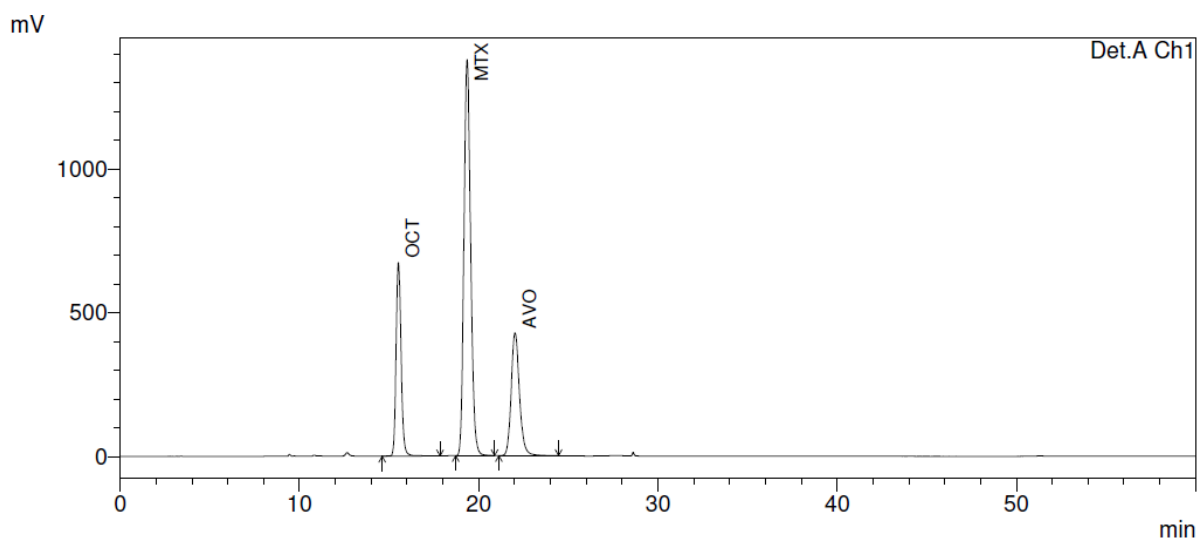
As concentrações dos filtros solares e antioxidantes presentes nas formulações em estudo (irradiadas e não irradiadas), e os seus respectivos valores de concentração remanescente, estão apresentados nas Tabelas 8 a 14 e nas Figuras 32 a 34.



A)

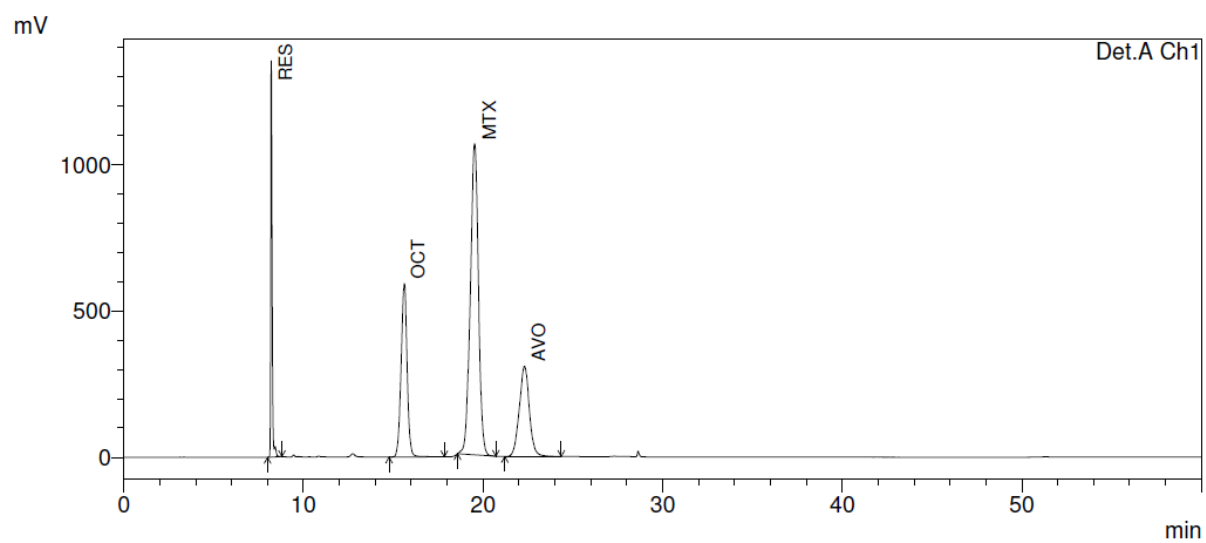


B)

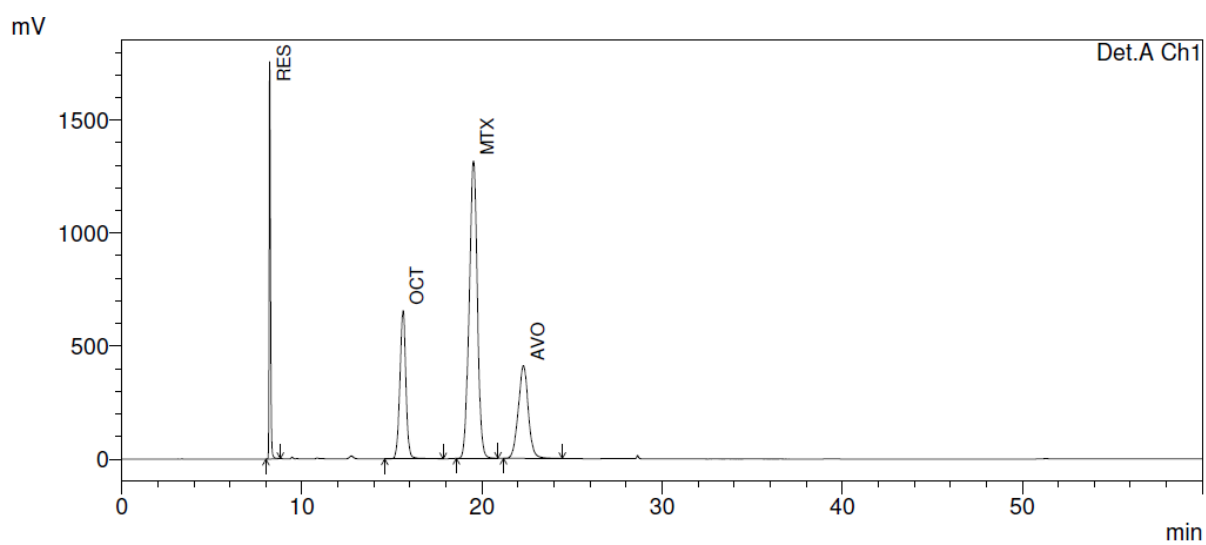


**Figura 20** – Cromatogramas das formulações F1F irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX) e avobenzona (AVO). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo:  $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; coluna de fase reversa C18, ( $5\mu\text{m}$ ),  $250\text{mm}\times 4\text{mm}$ ; detecção em 325 nm.

A)

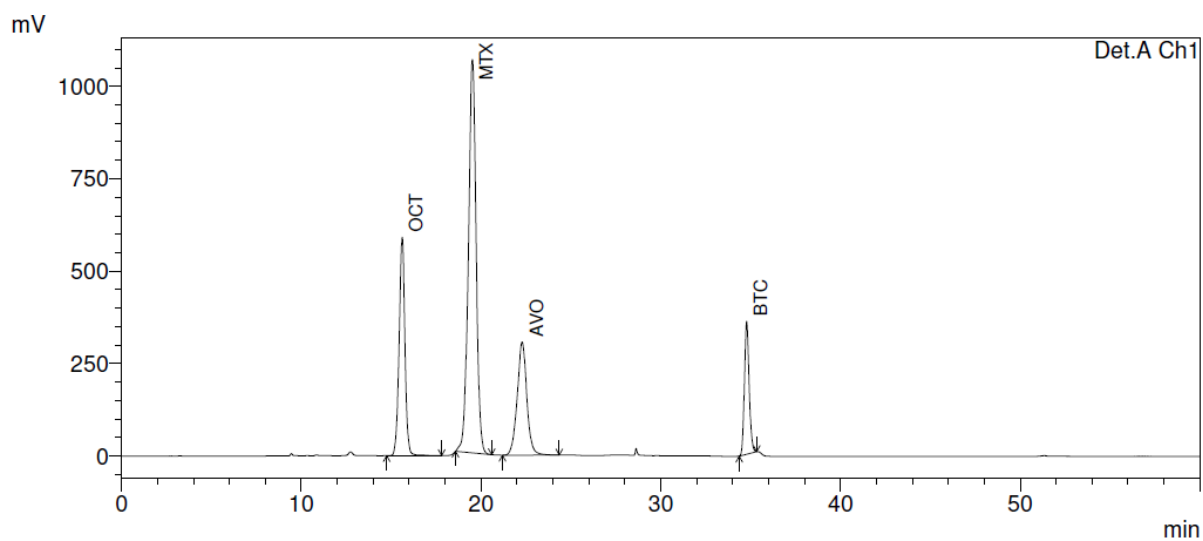


B)

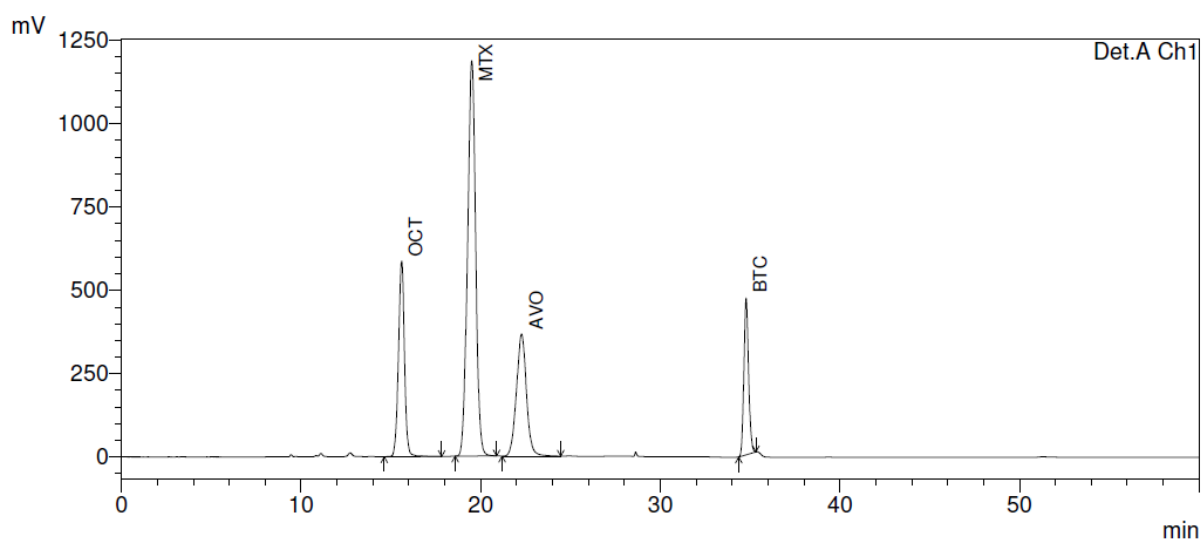


**Figura 21** – Cromatogramas das formulações FIR irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX) e avobenzona (AVO). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

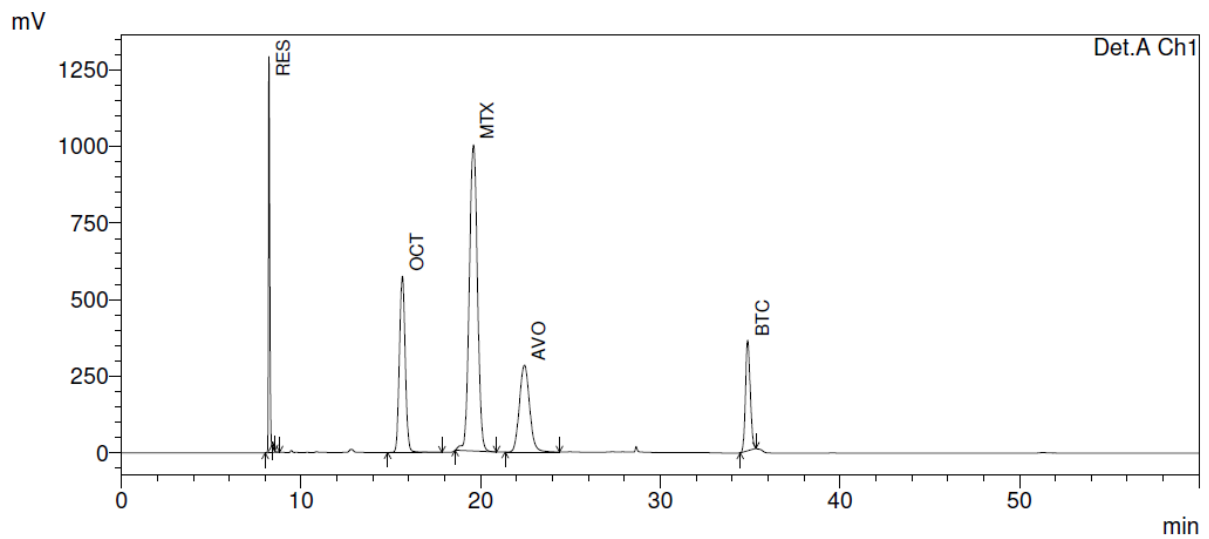


B)

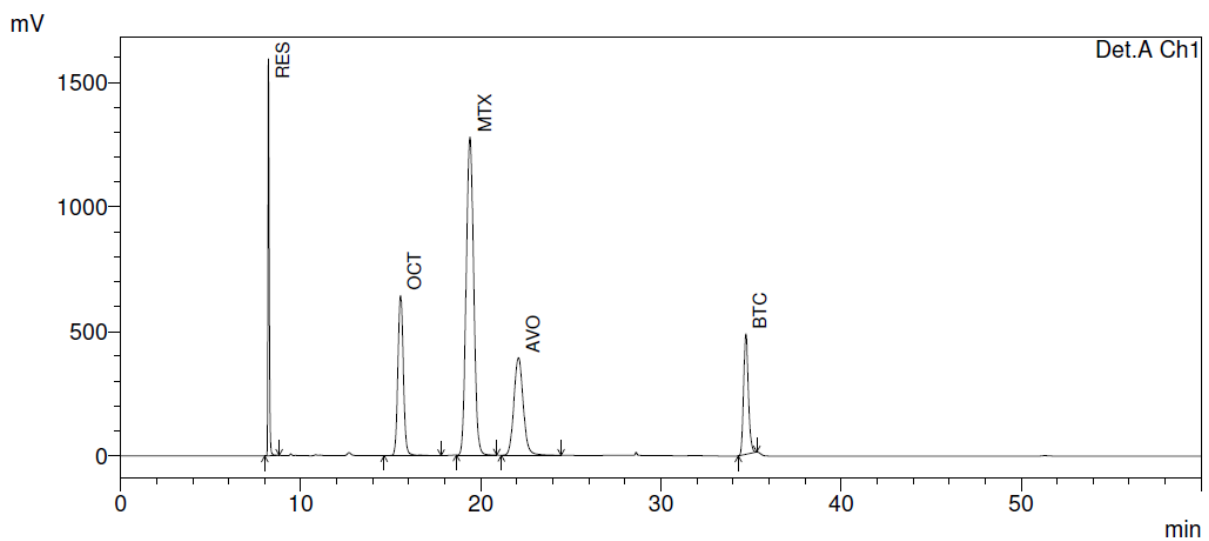


**Figura 22** – Cromatogramas das formulações F1B irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

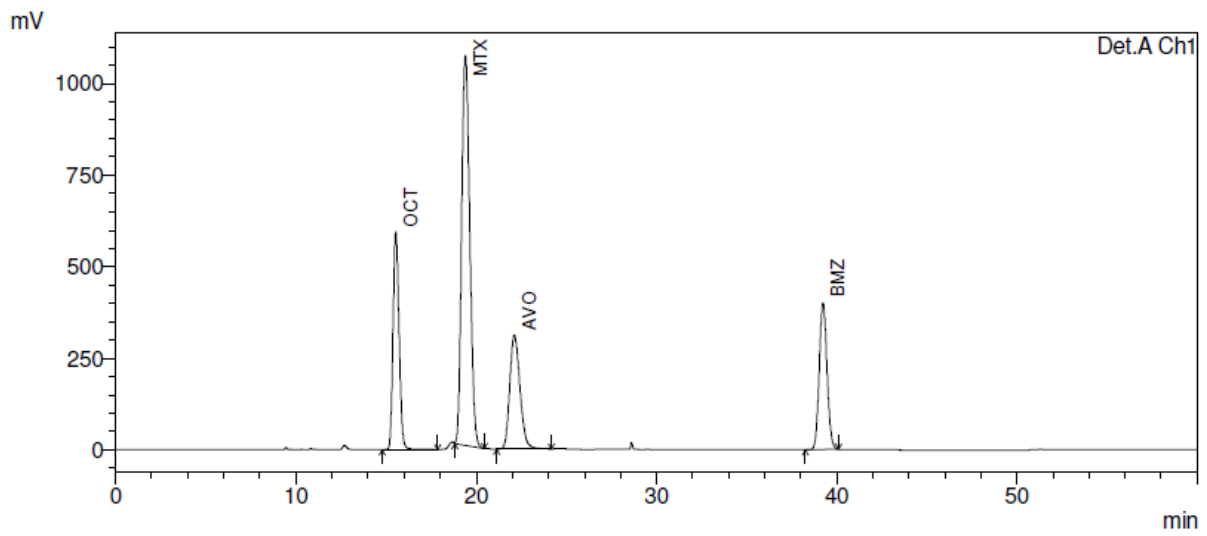


B)

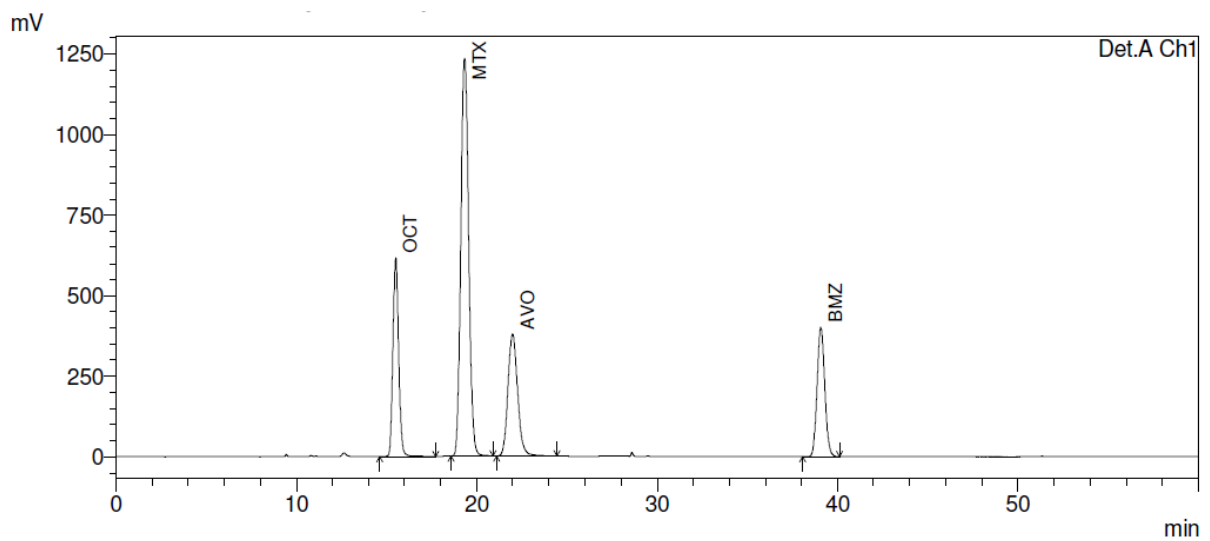


**Figura 23** – Cromatogramas das formulações F1RB irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

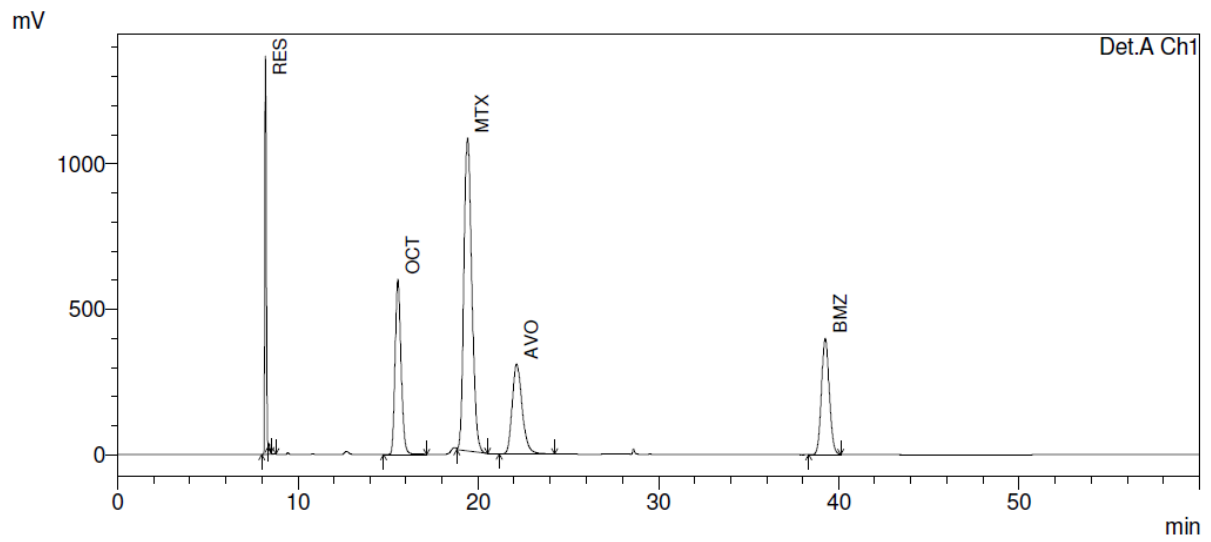


B)

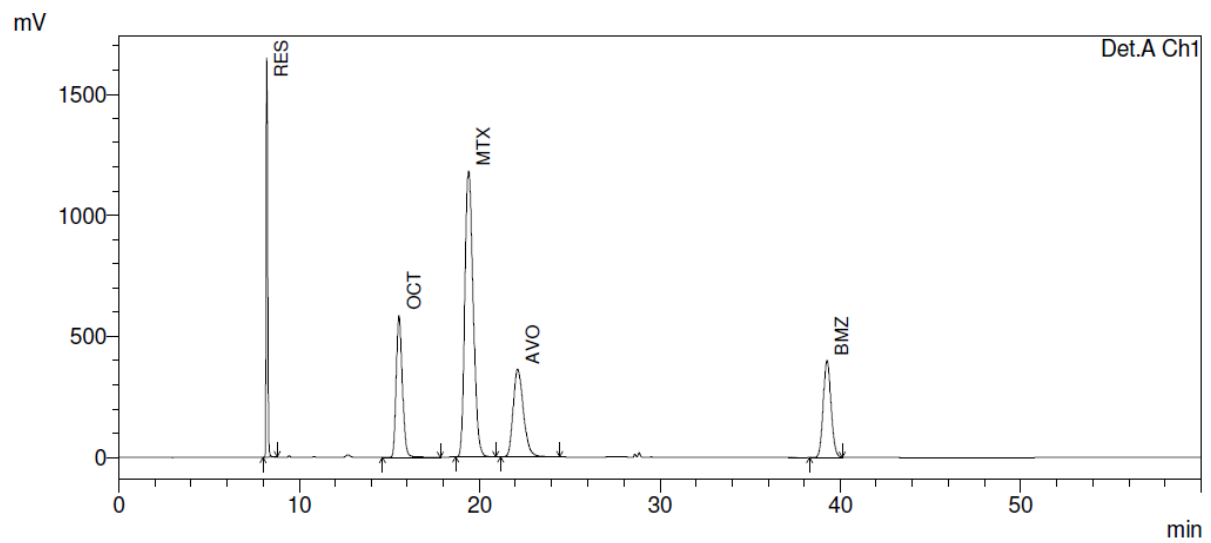


**Figura 24** – Cromatogramas das formulações F2F irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

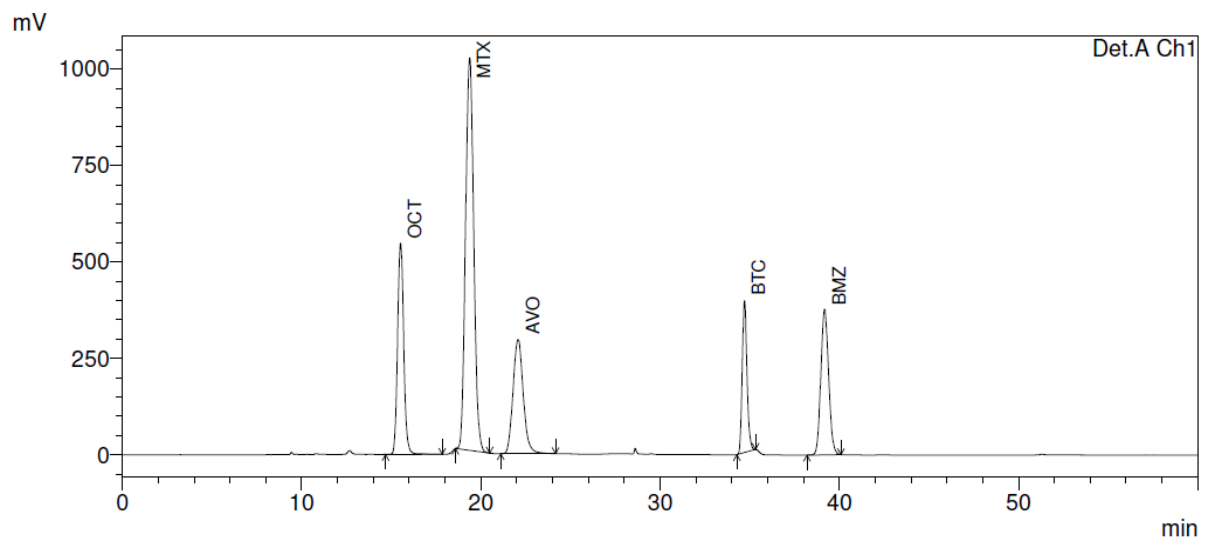


B)

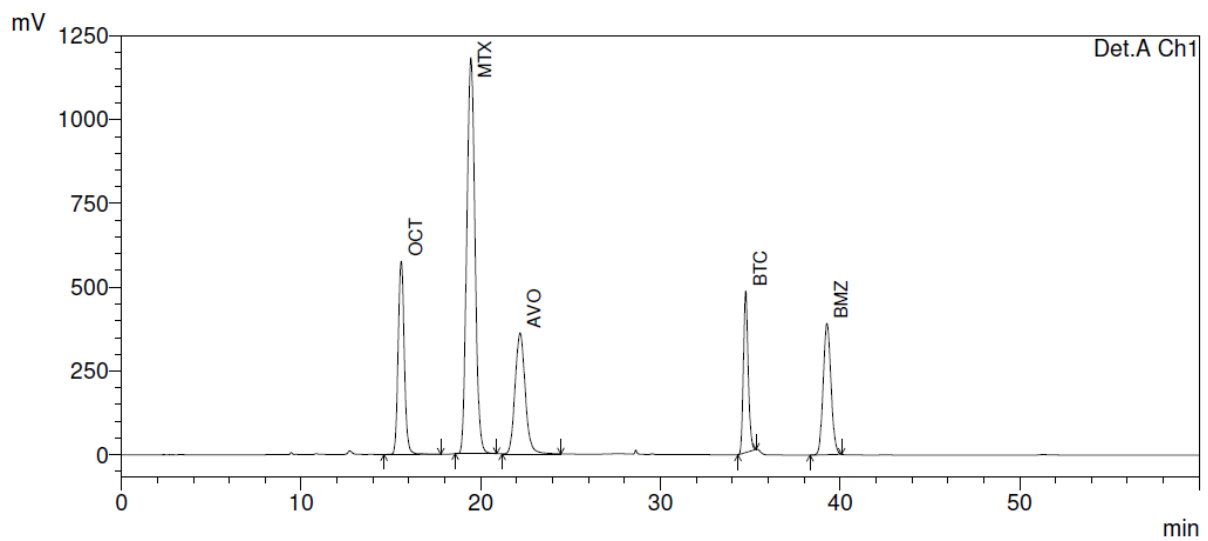


**Figura 25** – Cromatogramas das formulações F2R irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

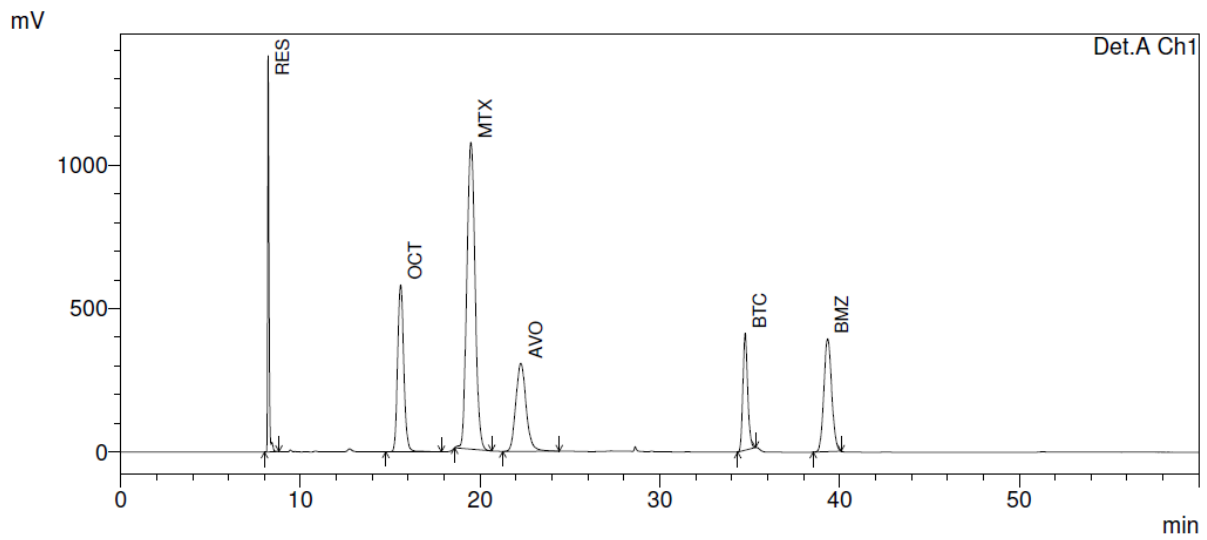


B)

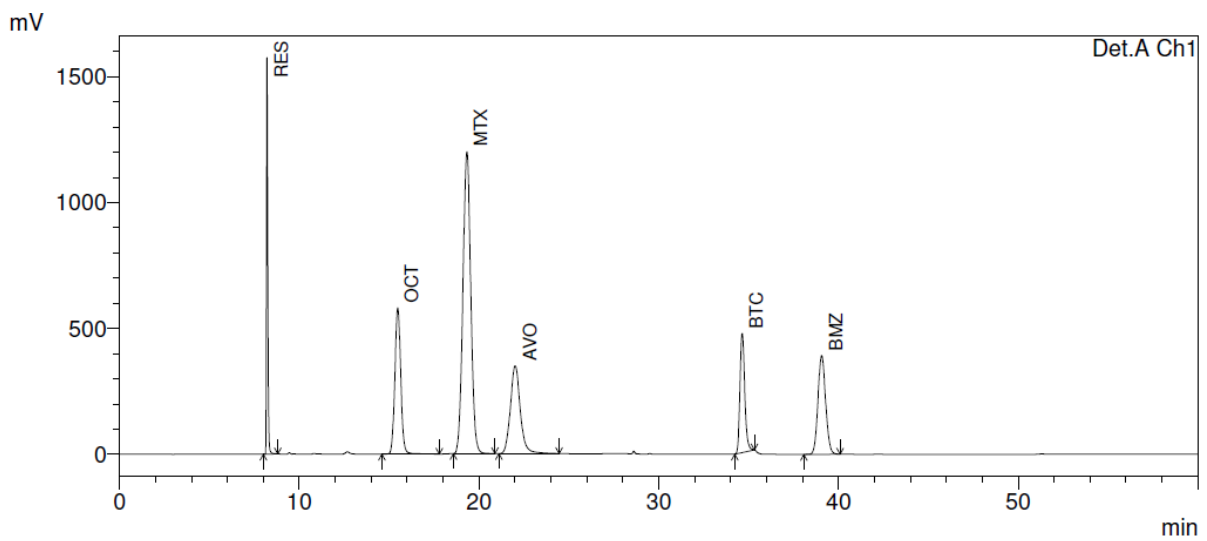


**Figura 26** – Cromatogramas das formulações F2B irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), beta-caroteno (BTC) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)



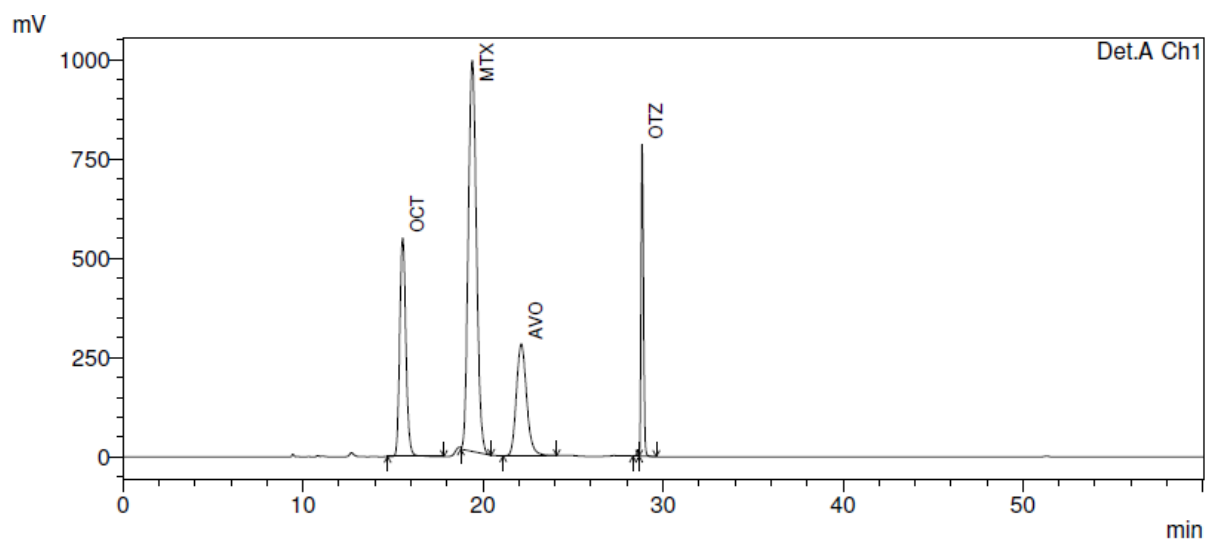
B)



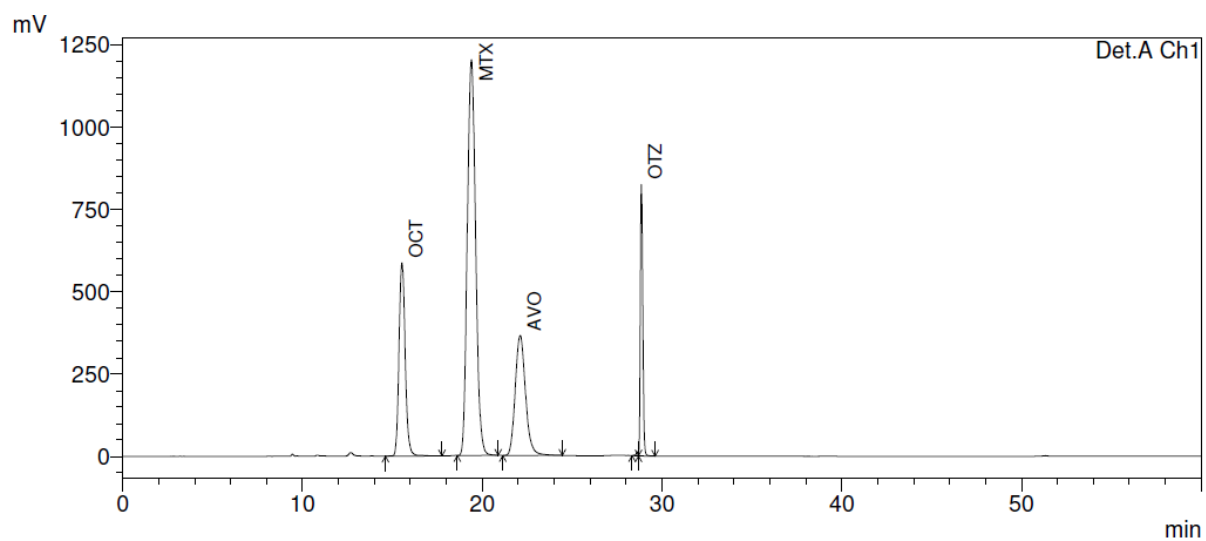
**Figura 27** – Cromatogramas das formulações F2RB irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), beta-caroteno (BTC) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.



A)

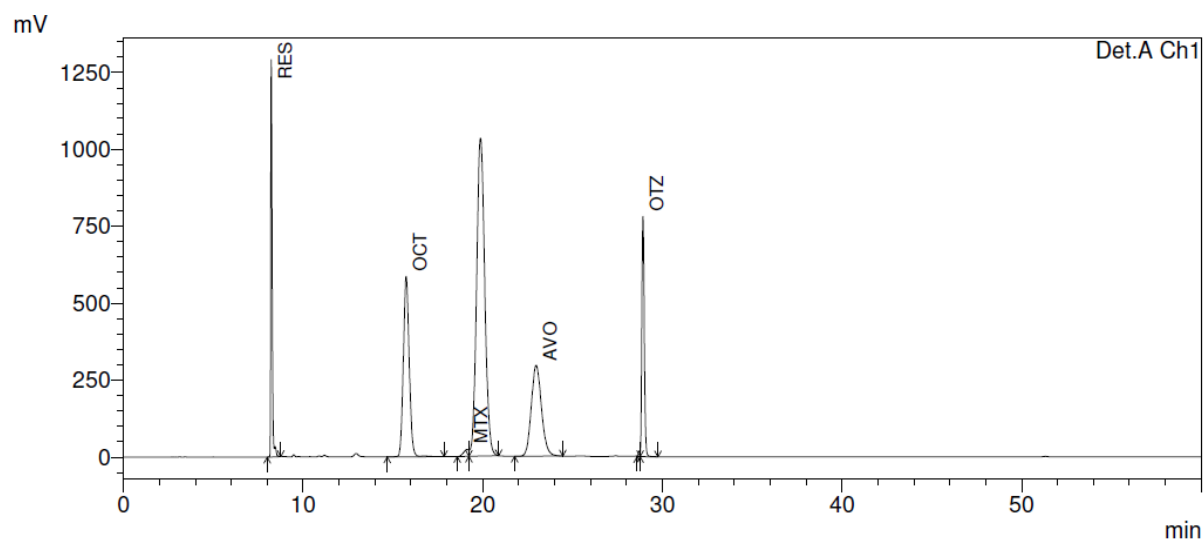


B)

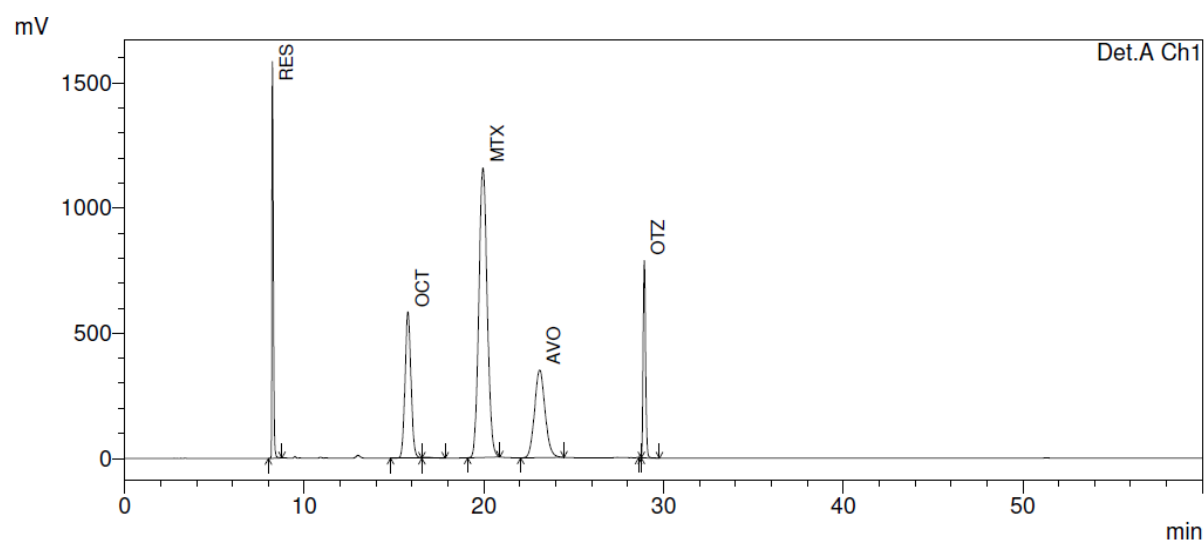


**Figura 28** – Cromatogramas das formulações F3F irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e octiltriazone (OTZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

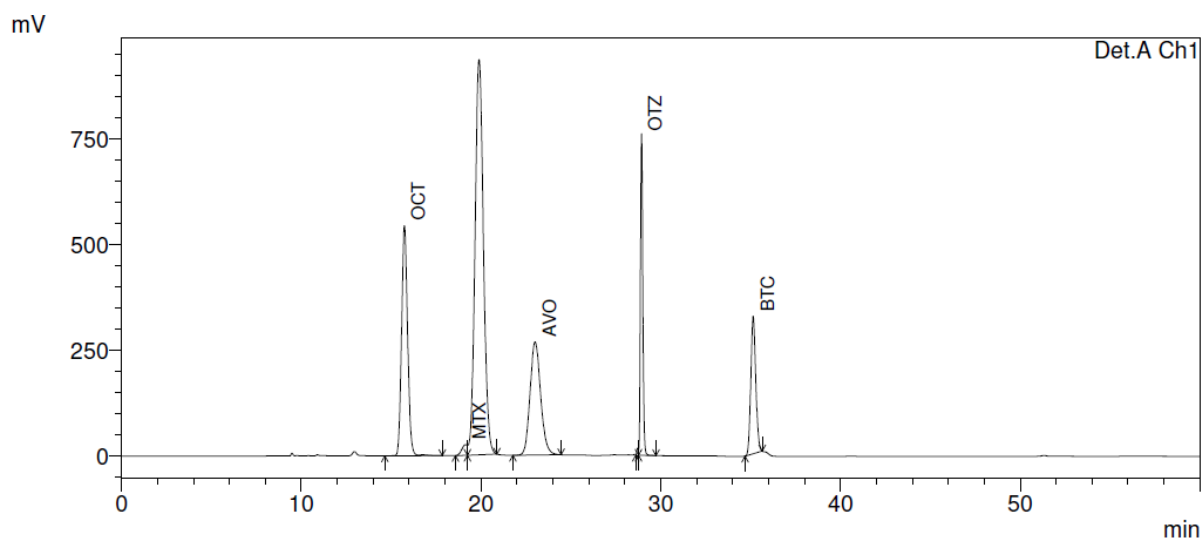


B)

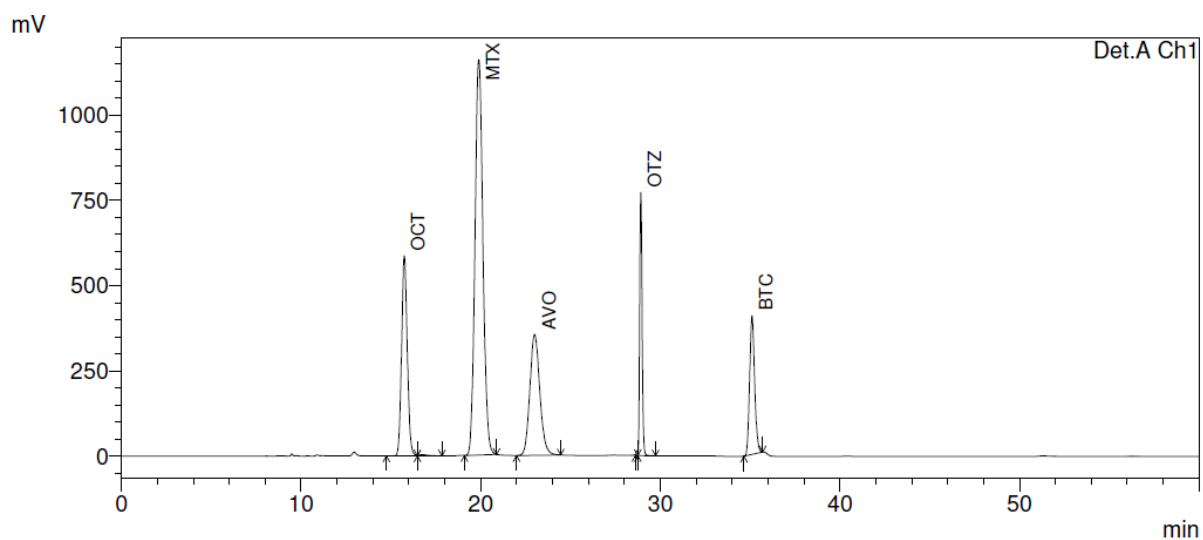


**Figura 29** – Cromatogramas das formulações F3R irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), octitriazona (OTZ) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)

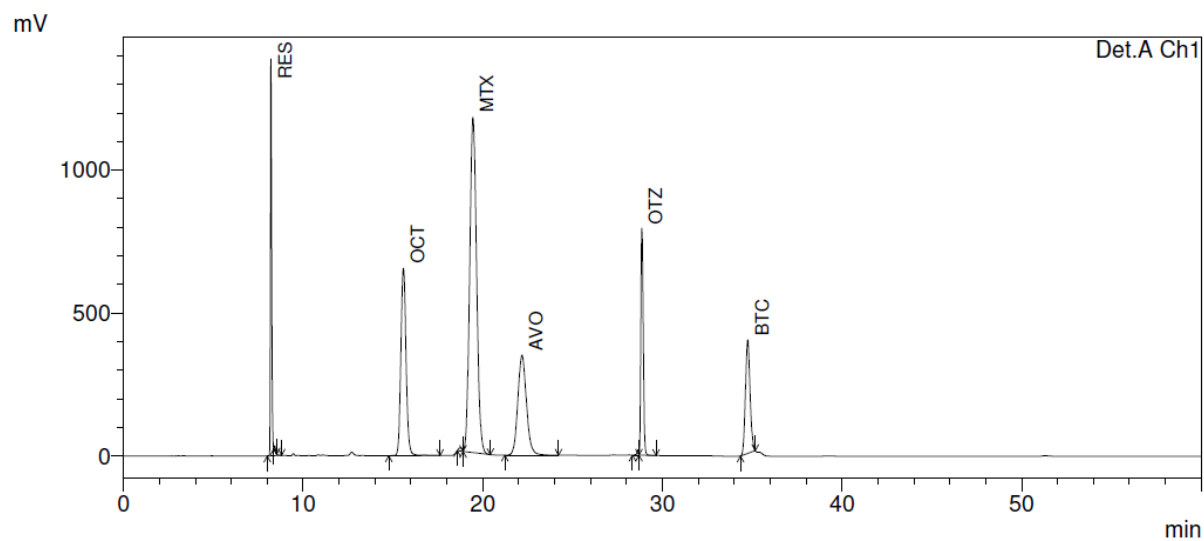


B)

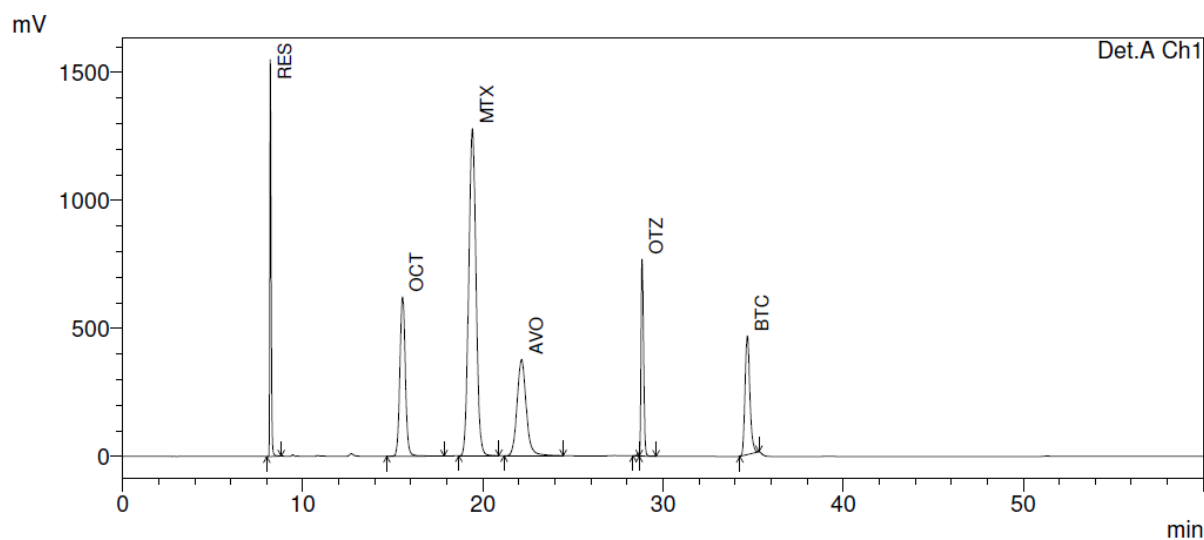


**Figura 30** – Cromatogramas das formulações F3B irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), octiltriazone (OTZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

A)



B)



**Figura 31** – Cromatogramas das formulações F3RB irradiada (A) e não irradiada (B). Picos: *trans*-resveratrol (RES), do octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), octiltriazone (OTZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 20.

**Tabela 8** – Concentrações remanescentes do *trans*-resveratrol nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F1R	16	13,37	17,22	77,66	80,05
		13,26	15,67	84,63	
		13,38	17,18	77,84	
F1RB	16	12,78	15,07	84,78	83,65
		12,65	15,17	83,39	
		12,16	14,68	82,78	
F2R	16	13,68	17,09	80,10	81,53
		13,21	15,94	82,87	
		13,23	16,21	81,63	
F2RB	16	13,61	15,48	87,95	87,87
		13,65	15,12	90,30	
		12,98	15,20	85,38	
F3R	16	13,29	16,96	78,37	81,16
		13,05	15,86	82,28	
		12,83	15,49	82,83	
F3RB	16	12,82	15,31	83,73	84,79
		13,20	14,99	88,06	
		13,19	15,97	82,59	

**Tabela 9** – Concentrações remanescentes do beta-caroteno nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F1B	9,6	8,43	10,44	80,76	79,06
		7,89	10,10	78,09	
		7,49	9,56	78,33	
F1RB	9,6	8,39	10,04	83,58	79,99
		7,94	10,46	75,84	
		7,96	9,88	80,55	
F2B	9,6	8,50	11,29	75,33	80,92
		8,67	10,49	82,69	
		8,76	10,34	84,73	
F2RB	9,6	8,99	10,71	83,93	85,74
		8,96	10,28	87,08	
		9,12	10,58	86,20	
F3B	9,6	8,10	9,86	82,19	83,71
		7,55	9,34	80,87	
		8,45	9,60	88,06	
F3RB	9,6	8,18	10,29	79,53	82,74
		8,49	10,20	83,19	
		8,78	10,27	85,51	

**Tabela 10** – Concentrações remanescentes do metoxicinamato de etil-hexila nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F1F	128	113,87	132,33	86,05	88,82
		113,78	129,53	87,84	
		118,75	128,30	92,56	
F1R	128	120,71	149,72	80,62	81,37
		118,13	137,38	85,98	
		113,96	147,04	77,50	
F1B	128	116,40	144,90	80,34	84,40
		114,90	134,60	85,36	
		113,06	129,21	87,51	
F1RB	128	115,79	129,14	89,66	87,61
		113,92	133,99	85,02	
		111,65	126,67	88,14	
F2F	128	118,33	146,92	80,54	87,17
		121,25	134,77	89,96	
		120,20	132,07	91,02	
F2R	128	122,19	148,14	82,48	86,39
		119,04	137,31	86,69	
		123,73	137,49	90,00	
F2B	128	113,28	146,12	77,52	83,63
		116,76	135,85	85,95	
		117,87	134,82	87,43	
F2RB	128	125,50	135,89	92,36	93,12
		123,47	131,65	93,79	
		125,68	134,85	93,20	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F3F	128	104,28	129,40	80,59	80,75
		112,21	140,41	79,92	
		104,89	128,34	81,73	
F3R	128	114,19	143,78	79,42	83,14
		117,80	135,12	87,18	
		111,20	134,24	82,84	
F3B	128	108,75	135,31	80,37	83,80
		110,00	128,79	85,41	
		110,42	128,97	85,61	
F3RB	128	109,98	132,21	83,18	85,24
		112,97	130,18	86,78	
		113,77	132,70	85,74	

conclusão



**Tabela 11** – Concentrações remanescentes do avobenzona nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F1F	64	53,86	65,81	81,84	84,68
		54,20	64,37	84,20	
		56,10	63,76	87,99	
F1R	64	56,57	74,56	75,88	76,50
		55,24	67,81	81,46	
		53,07	73,54	72,17	
F1B	64	54,98	72,12	76,23	79,37
		53,49	66,72	80,17	
		52,93	64,78	81,71	
F1RB	64	55,29	63,90	86,53	83,27
		52,59	66,31	79,30	
		52,38	62,36	84,00	
F2F	64	56,05	71,84	78,03	84,47
		57,58	66,43	86,68	
		57,18	64,47	88,69	
F2R	64	57,85	73,25	78,98	82,86
		56,04	67,62	82,87	
		58,90	67,91	86,72	
F2B	64	53,71	71,64	74,97	81,02
		55,45	66,52	83,36	
		55,92	66,00	84,72	
F2RB	64	58,45	65,11	89,77	90,94
		57,57	62,79	91,68	
		58,95	64,51	91,38	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F3F	64	48,74	62,84	77,57	77,97
		52,68	68,21	77,23	
		49,23	62,22	79,13	
F3R	64	52,93	71,58	73,95	78,88
		54,94	66,85	82,19	
		53,60	66,57	80,51	
F3B	64	51,80	67,30	76,97	79,28
		51,66	64,12	80,56	
		51,58	64,23	80,31	
F3RB	64	53,54	63,35	84,51	85,50
		55,20	62,73	88,01	
		53,39	63,57	83,98	

conclusão

**Tabela 12** – Concentrações remanescentes do bemotrizinol nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F2F	32	33,76	37,04	91,15	98,48
		34,40	34,06	100,98	
		34,22	33,12	103,32	
F2R	32	34,41	37,31	92,24	97,64
		34,44	34,35	100,28	
		34,87	34,73	100,39	
F2B	32	32,44	36,56	88,72	95,11
		32,56	33,84	96,22	
		33,70	33,57	100,38	
F2RB	32	34,35	34,49	99,58	101,08
		34,04	33,24	102,42	
		34,50	34,07	101,26	

**Tabela 13** – Concentrações remanescentes da oclitriazona nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F3F	32	32,82	33,99	96,57	96,27
		34,55	36,53	94,58	
		33,04	33,83	97,66	
F3R	32	35,53	37,58	94,54	96,66
		35,00	35,56	98,43	
		34,34	35,40	97,00	
F3B	32	33,61	36,03	93,27	97,35
		33,62	34,29	98,06	
		34,61	34,36	100,72	
F3RB	32	33,64	34,72	96,89	98,42
		34,13	34,53	98,84	
		34,50	34,66	99,52	

**Tabela 14** – Concentrações remanescentes do octocrileno nas formulações em estudo, quando submetidas a 275 KJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA.

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F1F	96	100,26	100,94	99,33	101,81
		98,82	98,44	100,39	
		103,10	97,53	105,71	
F1R	96	103,23	98,88	104,40	101,59
		102,23	103,52	98,76	
		98,69	97,13	101,61	
F1B	96	100,18	102,79	97,45	98,16
		99,40	102,01	97,44	
		97,58	97,98	99,59	
F1RB	96	101,46	97,90	103,63	99,94
		97,31	101,62	95,76	
		96,15	95,75	100,42	
F2F	96	101,64	110,91	91,64	98,69
		103,50	102,09	101,38	
		102,46	99,43	103,05	
F2R	96	104,17	112,80	92,35	97,01
		103,57	103,96	99,63	
		104,88	105,89	99,04	
F2B	96	97,21	95,66	101,62	98,38
		97,91	102,72	95,32	
		99,96	101,79	98,20	
F2RB	96	105,32	103,23	102,03	100,29
		96,17	99,67	96,48	
		104,55	102,15	102,36	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na formulação irradiada (µg/mL)	Concentração na formulação não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
F3F	96	92,94	90,23	103,00	100,07
		98,64	98,40	100,25	
		93,66	96,59	96,96	
F3R	96	100,88	100,31	100,58	99,19
		99,39	100,92	98,48	
		99,03	100,52	98,52	
F3B	96	95,25	102,31	93,10	97,05
		94,98	96,88	98,04	
		96,83	96,83	100,00	
F3RB	96	96,54	99,80	96,73	98,39
		98,11	98,43	99,67	
		98,52	99,74	98,77	

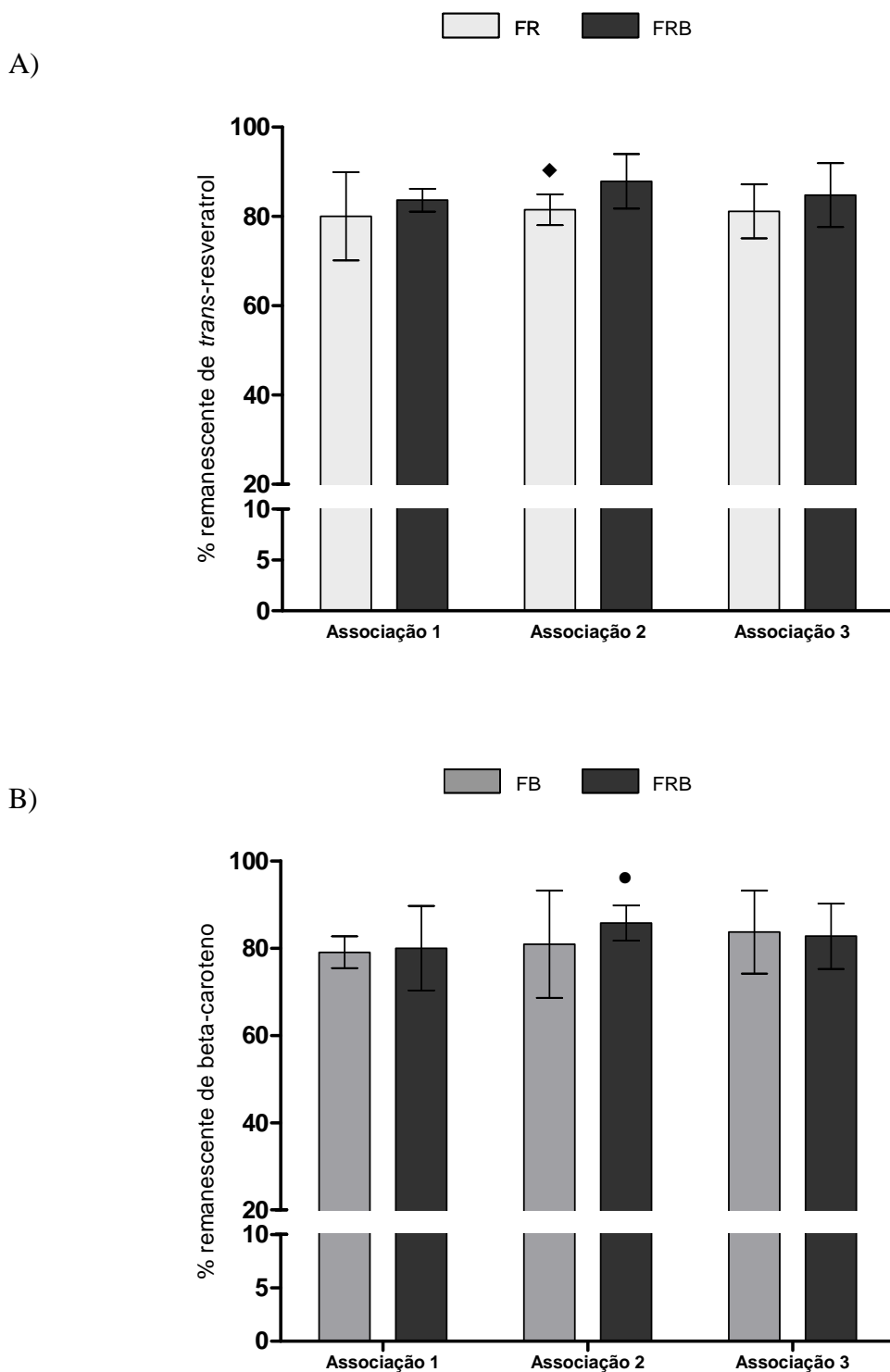
conclusão

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis dos resultados do estudo de fotoestabilidade por CLAE dos filtros solares e antioxidantes presentes nas formulações avaliadas mostrou que as substâncias em estudo foram fotoestáveis, com exceção do bemotrizinol, octiltriazona e octocrileno, os quais apresentaram porcentagem remanescente média em torno de 100% (Figura 34). O *trans-resveratrol*, o beta-caroteno, o metoxicinamato de etil-hexila e a avobenzona, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre seus valores de concentração nas formulações não irradiadas e irradiadas, o que resultou em queda significativa da porcentagem remanescente, a qual ficou em torno de 84% para essas substâncias (Figuras 32 e 33).

Ao analisar a influência das diferentes associações de filtros solares (associações 1, 2 e 3) na fotoestabilidade das substâncias em estudo, observou-se aumento da fotoestabilidade do beta-caroteno e da avobenzona quando estes estavam presentes na formulação contendo a associação 2 combinada com o *trans-resveratrol* e o beta-caroteno (F2RB), com relação à mesma formulação contendo a associação 1 de filtros solares (F1RB) ( $p < 0,05$ ) (Figuras 32B e 33B). Quando a associação 3 foi analisada, observou-se redução da fotoestabilidade da avobenzona quando a mesma estava presente na formulação contendo a associação 3 (F3F), com relação à mesma formulação contendo a associação 1 de filtros solares (F1F) ( $p < 0,05$ ) (Figura 33B).

Quando a porcentagem remanescente do *trans*-resveratrol, do metoxicinamato de etil-hexila e da avobenzona foram analisadas, foi observado que o uso dos antioxidantes em associação é melhor do que utilizá-los separadamente em fotoprotetores. Os resultados mostraram que houve redução estatisticamente significativa da fotoestabilidade do *trans*-resveratrol, do metoxicinamato de etil-hexila, nas formulações F2R e F2B, respectivamente, bem como da avobenzona nas formulações F2R e F2B, quando comparados com a F2RB ( $p < 0,05$ ) (Figuras 32A, 33A e 33B). Ainda em relação à avobenzona, também foi observada redução estatisticamente significativa da sua fotoestabilidade nas formulações F1R, F3R e F3B quando comparadas às formulações contendo a combinação dos dois antioxidantes, dentro da mesma associação de filtros solares (F1RB ou F3RB) ( $p < 0,05$ ) (Figura 33B).

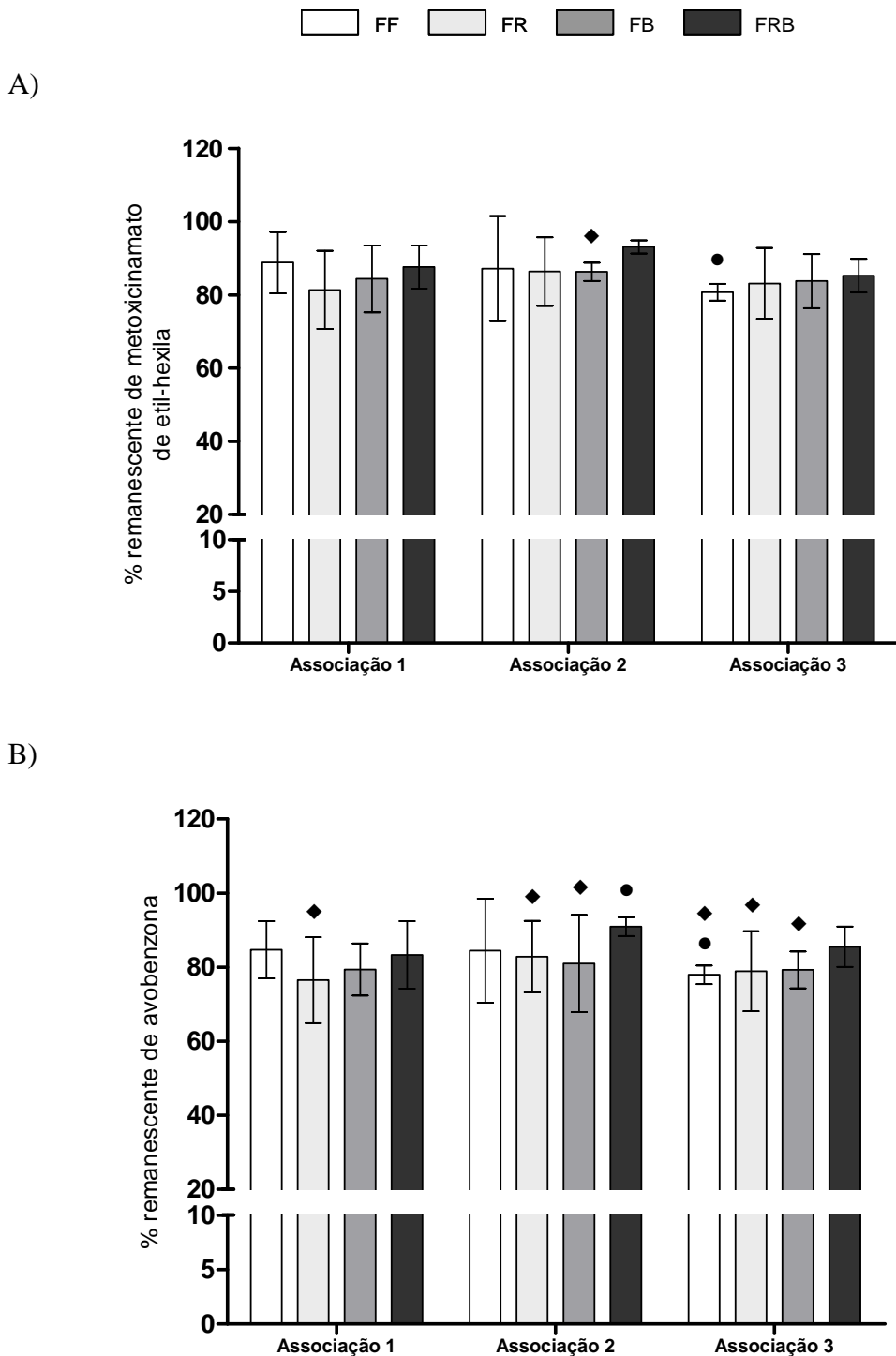
Observou-se ainda que o uso dos antioxidantes em combinação promoveu melhora da fotoestabilidade da avobenzona na associação 3, considerada mais fotoinstável, uma vez que a porcentagem remanescente da avobenzona na F3RB foi estatisticamente maior que na F3F ( $p < 0,05$ ) (Figura 33B).



**Figura 32** – Porcentagem remanescente do *trans*-resveratrol (A) e beta-caroteno (B) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 ( mediana e intervalo de confiança 95%).

●: estatisticamente diferente da formulação F1RB (p<0,05).

◆: estatisticamente diferente da formulação F2RB (p<0,05).

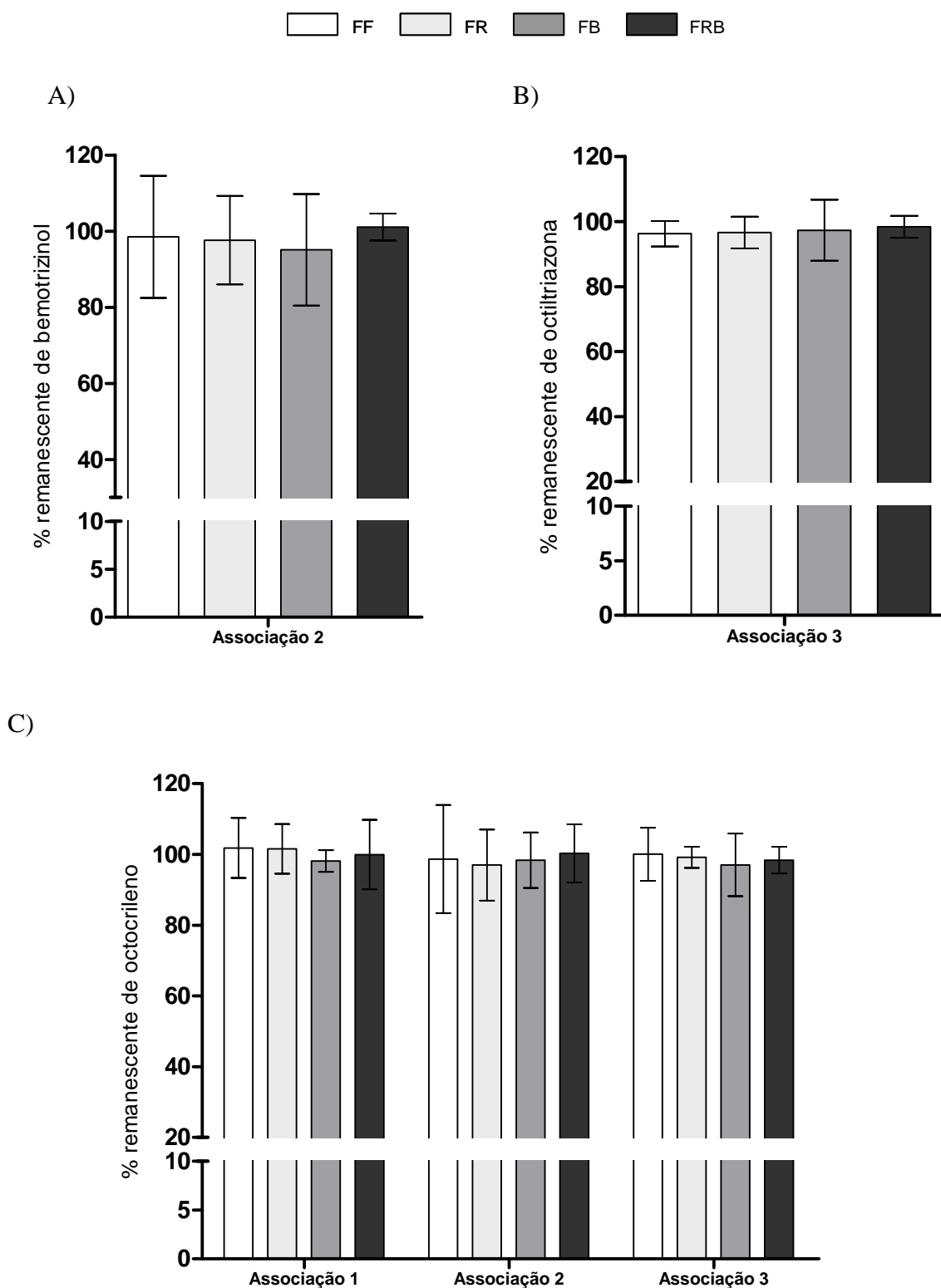


**Figura 33** – Porcentagem remanescente do metoxicinamato de etil-hexila (A) e avobenzona (B) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis,  $n=3$  ( mediana e intervalo de confiança 95%).

● : estatisticamente diferente da mesma formulação contendo a associação 1 de filtros solares (F1F ou F1RB)( $p<0,05$ ).

◆: estatisticamente diferente de F1RB ou F2RB ou F3RB, ou seja, da formulação contendo a combinação dos dois antioxidantes, dentro da mesma associação de filtros solares ( $p<0,05$ ).





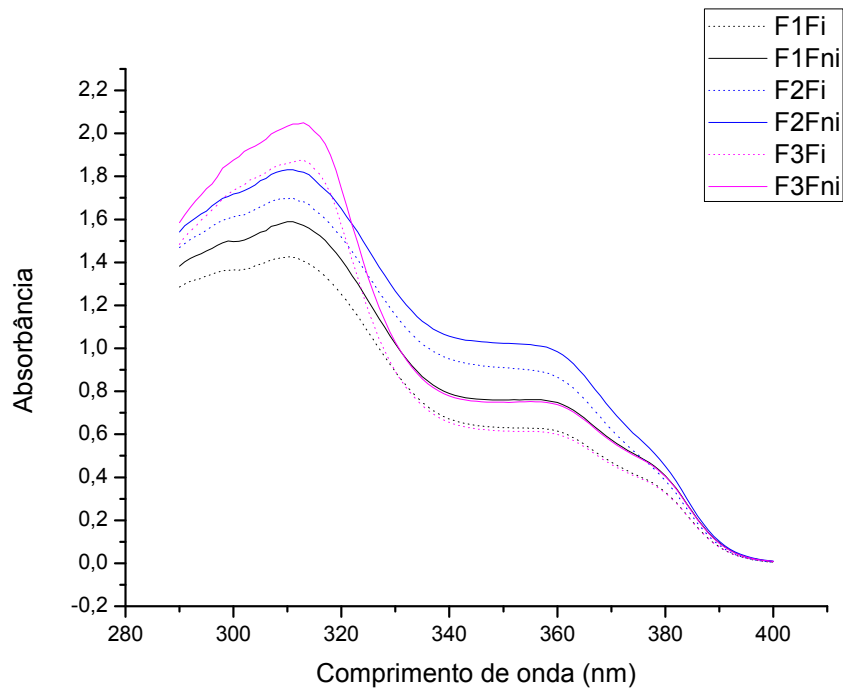
**Figura 34** – Porcentagem remanescente do bemotrizinol (A), octiltriazone (B) e octocrileno (C) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 ( mediana e intervalo de confiança 95%).

### **5.2.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV**

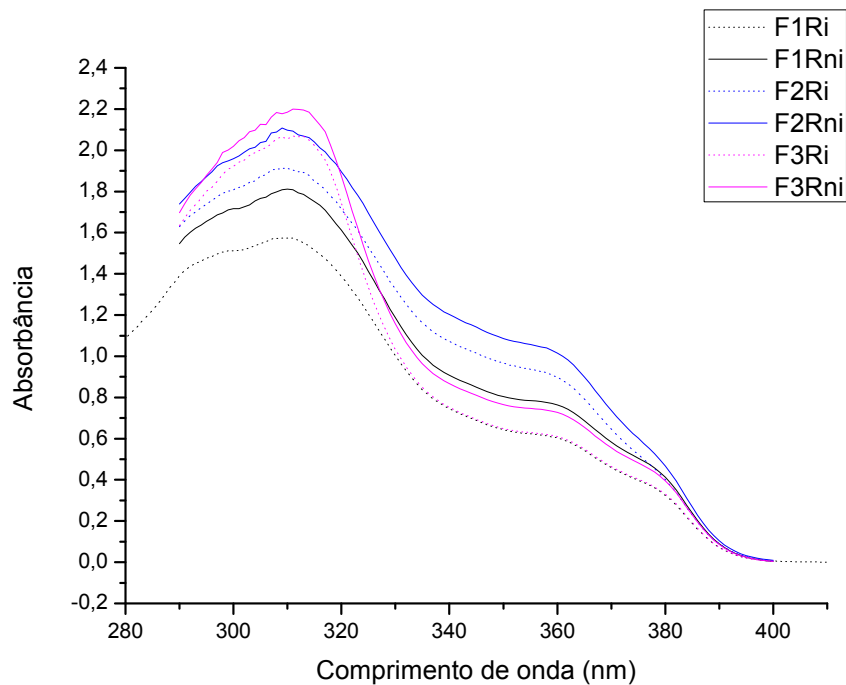
As Figuras 35 e 36 representam os espectros de varredura no UV (290-400nm) das formulações em estudo, quando submetidas ou não à irradiação.

Os valores da integral do espectro de absorção obtidos após a varredura na faixa da radiação UVA e UVB, bem como os valores de razão UVA/UVB das formulações em estudo, submetidas ou não à irradiação, estão apresentados na Tabela 15, e o gráfico da razão UVA/UVB dessas mesmas formulações está apresentado na Figura 37.

A)

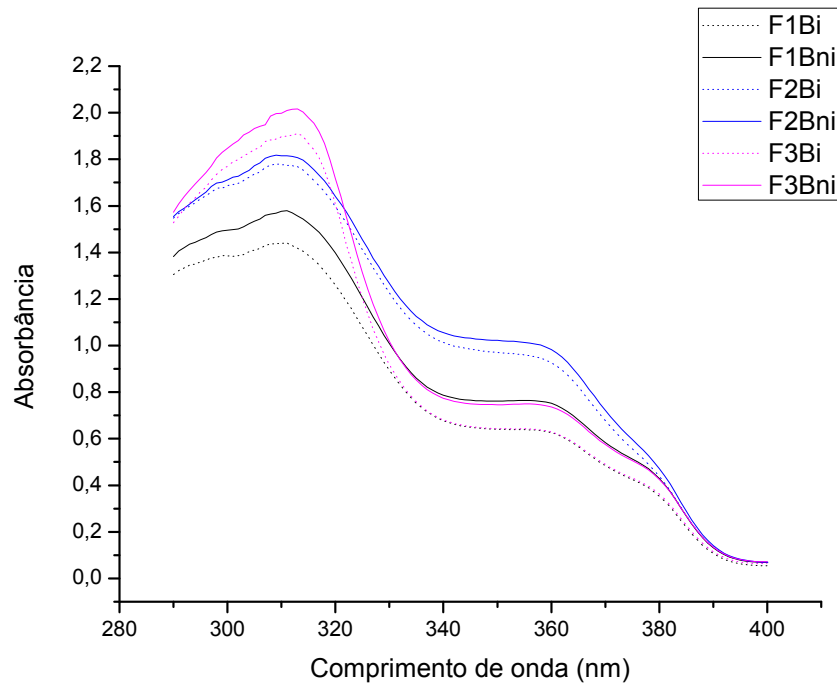


B)

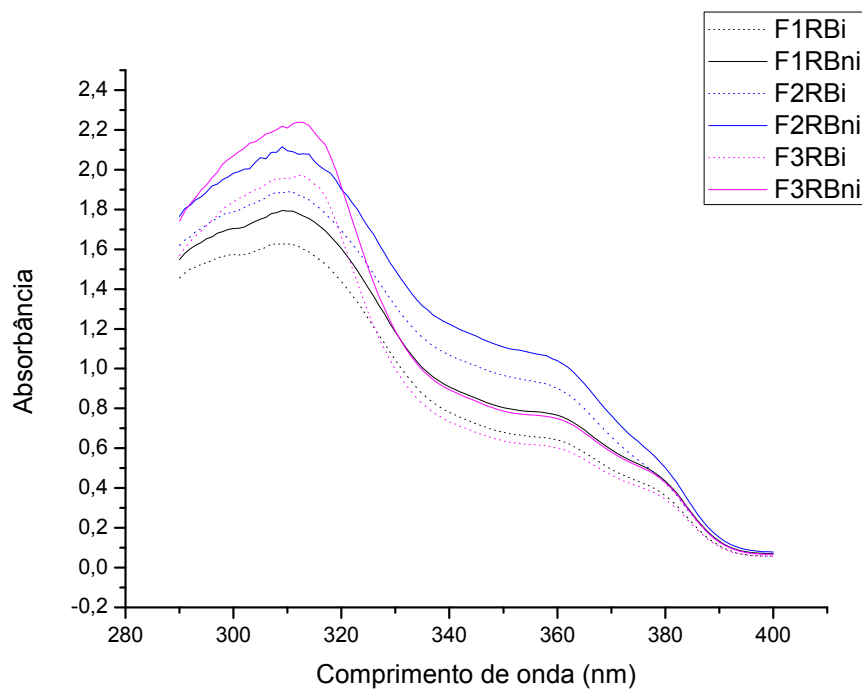


**Figura 35** – Espectro de varredura no UV (290-400nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo a associação 1, 2 e 3 de filtros solares. **(A)**: Formulações FF, ou seja, contendo apenas filtros solares. **(B)**: Formulações FR, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol.

A)



B)



**Figura 36** – Espectro de varredura no UV (290-400nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo a associação 1, 2 e 3 de filtros solares. **(A)**: Formulações FB, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de beta-caroteno. **(B)**: Formulações FRB, ou seja, contendo filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno.

**Tabela 15** – Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa da UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação.

Formulação	Integral do espectro de absorção UVA (320-400nm)		Integral do espectro de absorção UVB (290-320nm)		Razão UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB após irradiação
	Irradiada	Não irradiada	Irradiada	Não irradiada	Irradiada	Não irradiada	
F1F	41,59	51,28	40,27	45,98	1,03	1,12	0,07
	43,75	50,89	42,22	45,28	1,04	1,12	0,08
	42,87	50,74	40,91	45,20	1,05	1,12	0,07
F1R	44,91	53,38	44,54	49,85	1,01	1,07	0,06
	46,25	54,37	46,29	50,67	1,00	1,07	0,07
	45,20	55,25	45,20	51,50	1,00	1,07	0,07
F1B	43,69	52,42	40,70	45,95	1,07	1,14	0,06
	44,66	51,32	41,82	44,91	1,07	1,14	0,07
	44,10	51,55	41,43	45,00	1,06	1,15	0,07
F1RB	44,96	53,35	43,32	48,54	1,04	1,10	0,06
	46,82	55,71	45,29	50,73	1,03	1,10	0,06
	48,28	56,29	46,86	51,18	1,03	1,10	0,06
F2F	53,34	63,27	45,19	51,44	1,18	1,23	0,04
	56,97	60,62	48,22	49,03	1,18	1,24	0,04
	57,06	64,00	48,40	51,87	1,18	1,23	0,04
F2R	58,49	66,30	51,22	56,34	1,14	1,18	0,03
	60,37	65,64	53,16	55,39	1,14	1,19	0,04
	62,30	70,08	54,43	59,26	1,14	1,18	0,03
F2B	54,93	63,23	45,43	50,79	1,21	1,24	0,03
	59,58	62,64	48,80	50,01	1,22	1,25	0,03
	61,90	64,86	50,79	51,72	1,22	1,25	0,03
F2RB	61,90	69,25	52,89	57,15	1,17	1,21	0,03
	62,46	67,87	53,44	55,93	1,17	1,21	0,04
	63,17	72,44	53,79	59,64	1,17	1,21	0,03

Formulação	Integral do espectro de absorção UVA (320-400nm)		Integral do espectro de absorção UVB (290-320nm)		Razão UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB após irradiação
	Irradiada	Não irradiada	Irradiada	Não irradiada	Irradiada	Não irradiada	
F3F	42,02	50,62	50,50	56,12	0,83	0,90	0,08
	44,86	50,77	53,56	55,93	0,84	0,91	0,08
	43,44	51,59	52,21	56,74	0,83	0,91	0,08
F3R	44,86	54,49	54,71	61,46	0,82	0,89	0,08
	43,79	54,36	53,23	60,90	0,82	0,89	0,08
	47,13	54,17	57,77	61,07	0,82	0,89	0,08
F3B	42,96	54,05	50,05	58,12	0,86	0,93	0,08
	45,88	53,22	53,47	57,09	0,86	0,93	0,08
	46,00	52,32	53,30	55,90	0,86	0,94	0,08
F3RB	48,14	54,26	56,97	59,85	0,85	0,91	0,07
	48,61	56,05	57,09	61,76	0,85	0,91	0,06
	46,75	56,72	55,17	62,31	0,85	0,91	0,07

conclusão

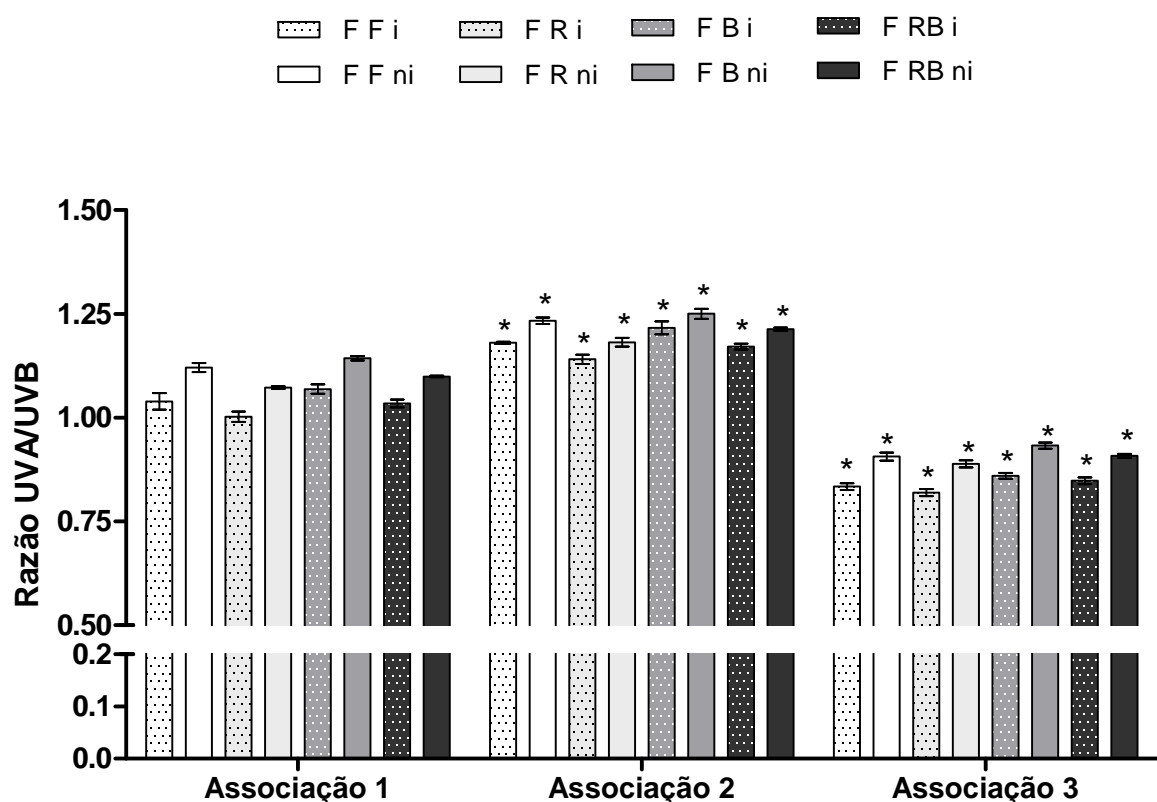
Os espectros de varredura no UV das formulações avaliadas mostraram que houve redução da área sobre a curva de todas as formulações irradiadas quando comparadas aos seus respectivos pares não irradiados ao longo de toda faixa analisada, ou seja, de 290 a 400nm. Além disso, as formulações contendo as associações 2 e 3 de filtros solares apresentaram, respectivamente, maior absorção na faixa da UVA e da UVB quando comparadas com as formulações contendo a associação 1 (Figuras 35 e 36).

De acordo com a análise estatística todas as formulações em estudo foram consideradas fotoinstáveis, pois houve redução significativa da razão UVA/UVB ( $p < 0,01$ ) após irradiação por UVA (Figura 37 e Tabela 15). Apesar disso, a razão UVA/UVB se manteve elevada ( $> 0,83$ ) em todas as formulações irradiadas (Figura 37).

Ao comparar os valores de razão UVA/UVB das formulações, submetidas ou não à irradiação, contendo a associação 1 de filtros solares com seus correspondentes que apresentavam bemotrizinol (associação 2) e octiltriazone (associação 3) foi observado que as formulações contendo bemotrizinol e octiltriazone apresentaram, respectivamente, aumento e redução significativos da razão UVA/UVB com relação às formulações da associação 1 ( $p < 0,01$ ) (Figura 37).

De forma geral, ao analisar os valores de queda na razão UVA/UVB das formulações contendo as três associações de filtros solares, foi observado que o bemotrizinol, presente na associação 2, proporcionou um aumento estatisticamente significativo da fotoestabilidade das formulações, enquanto que a octiltriazona, reduziu a fotoestabilidade das mesmas ( $p < 0,05$ ), quando essas formulações foram comparadas com as que continham a associação 1. A presença da octiltriazona (associação 3) somente não reduziu a fotoestabilidade das formulações em estudo quando os antioxidantes foram utilizados em combinação, ou seja, apenas a F3RB foi considerada estatisticamente equivalente à F1RB.

Finalizando, as formulações F2F, F2R, F2B e F2RB, as quais continham o filtro solar bemotrizinol, foram consideradas as mais fotoestáveis dentre todas as estudadas, uma vez que, de acordo com os resultados obtidos por CLAE, houve aumento da fotoestabilidade do beta-caroteno e da avobenzona quando estes estavam presentes nas formulações contendo a associação 2. Além disso, o estudo por espectrofotometria mostrou que as formulações contendo a associação 2 foram as mais fotoestáveis dentre as estudadas.



**Figura 37** – Razão UVA/UVB de todas as formulações em estudo, irradiadas (barras com textura) e não irradiadas, contendo: filtros solares (FF), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (FR), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (FB) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (FRB). Teste de Kruskal-Wallis, n=3 (mediana e intervalo de confiança 95%).

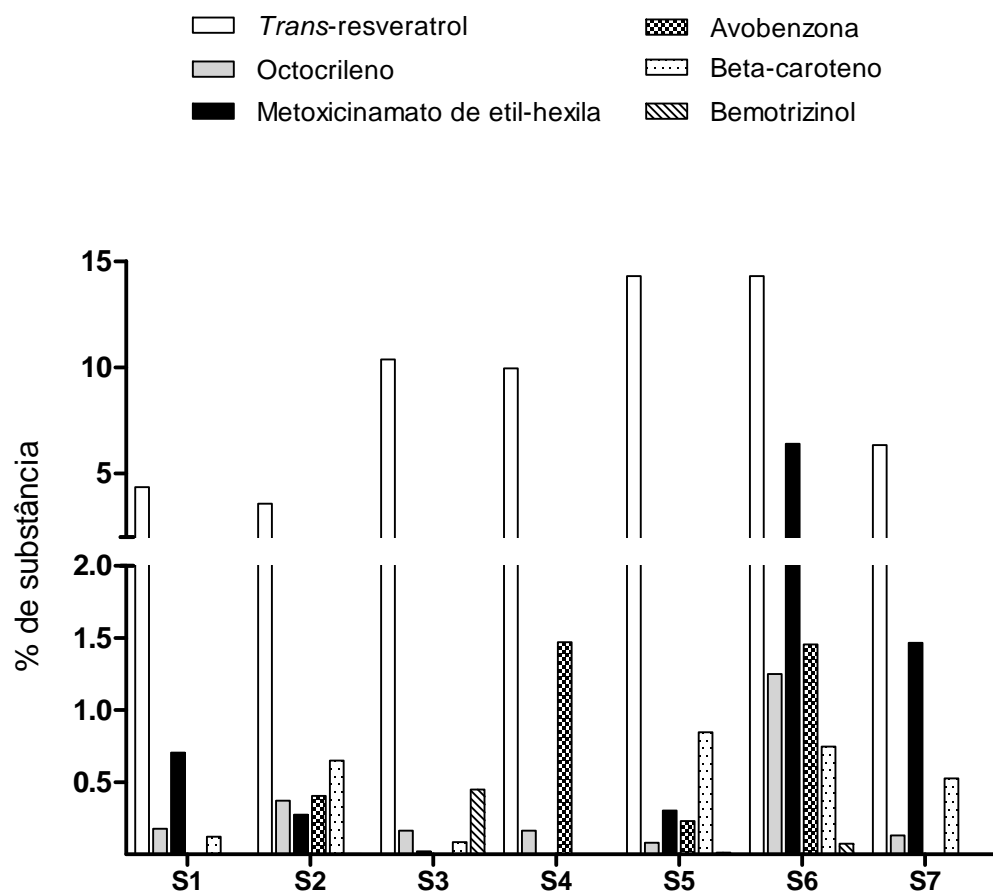
\*: estatisticamente diferente da mesma formulação, irradiada ou não irradiada, contendo a associação 1 de filtros solares ( $p < 0,01$ ).

### 5.3. Estudo de penetração cutânea *in vitro* dos filtros solares e antioxidantes

#### 5.3.1. Determinação da solução receptora

O gráfico apresentado na Figura 38 corresponde aos resultados dos ensaios preliminares de solubilidade, os quais indicam que a solução receptora composta por tampão fosfato pH 7.4 (0.1M) acrescida 4% de BSA (S6), forneceu maior solubilidade para todas as substâncias analisadas, sendo que o bemotrizinol foi o que apresentou a menor taxa de solubilidade neste meio (0,07%).



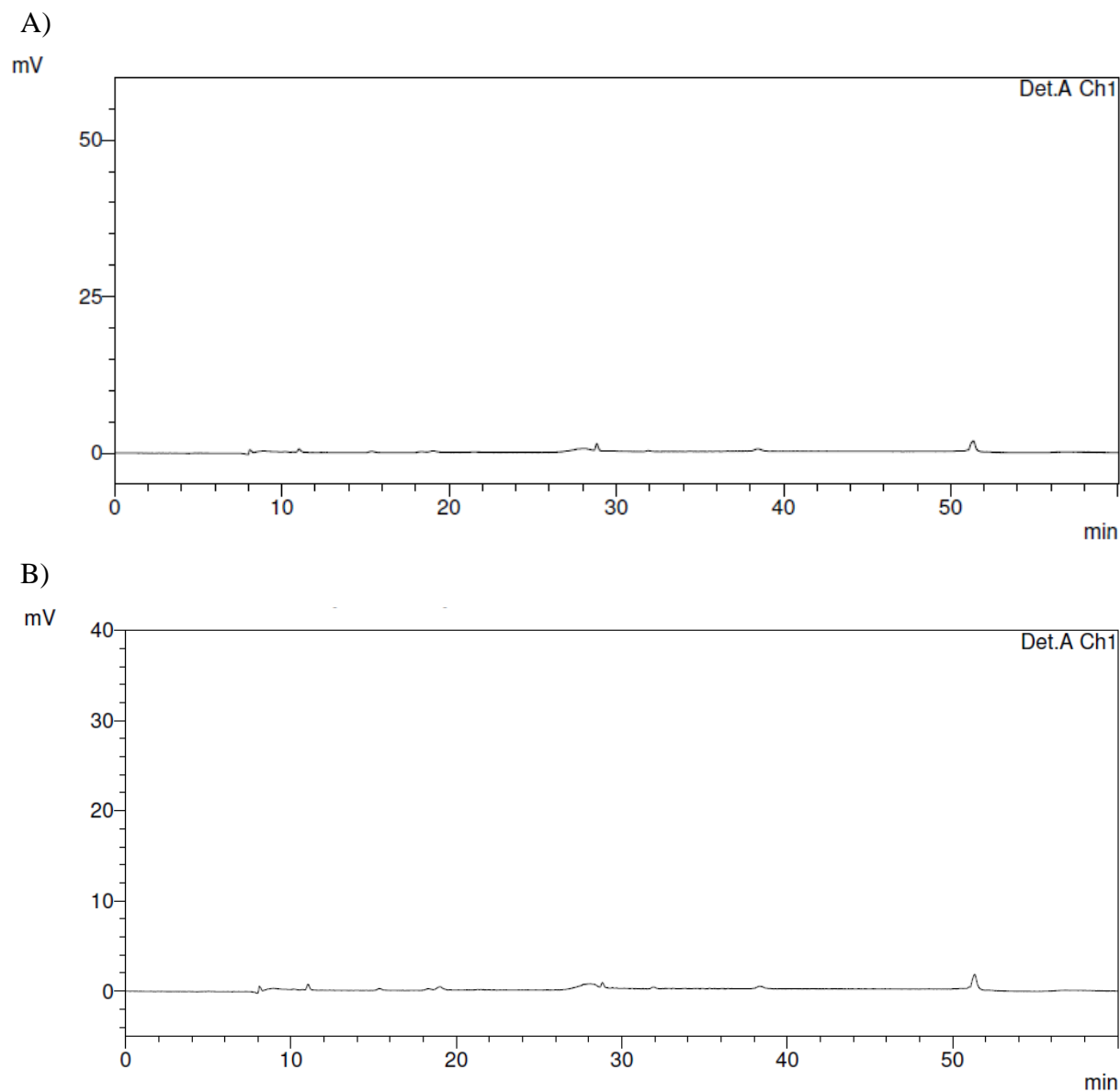


**Figura 38** – Porcentagem de solubilidade dos ativos nas diferentes soluções receptoras avaliadas (7 mL), com agitação de 300 rpm, durante 4 horas e meia. S1: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M); S2: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 10% de etanol; S3: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 30% de etanol; S4: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 4% de polissorbato 80; S5: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 10% de propilenoglicol; S6: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1M) com 4% de BSA; e S7: Tampão fosfato, pH 7.4 (0.1 M) com 2% de Olet-3.

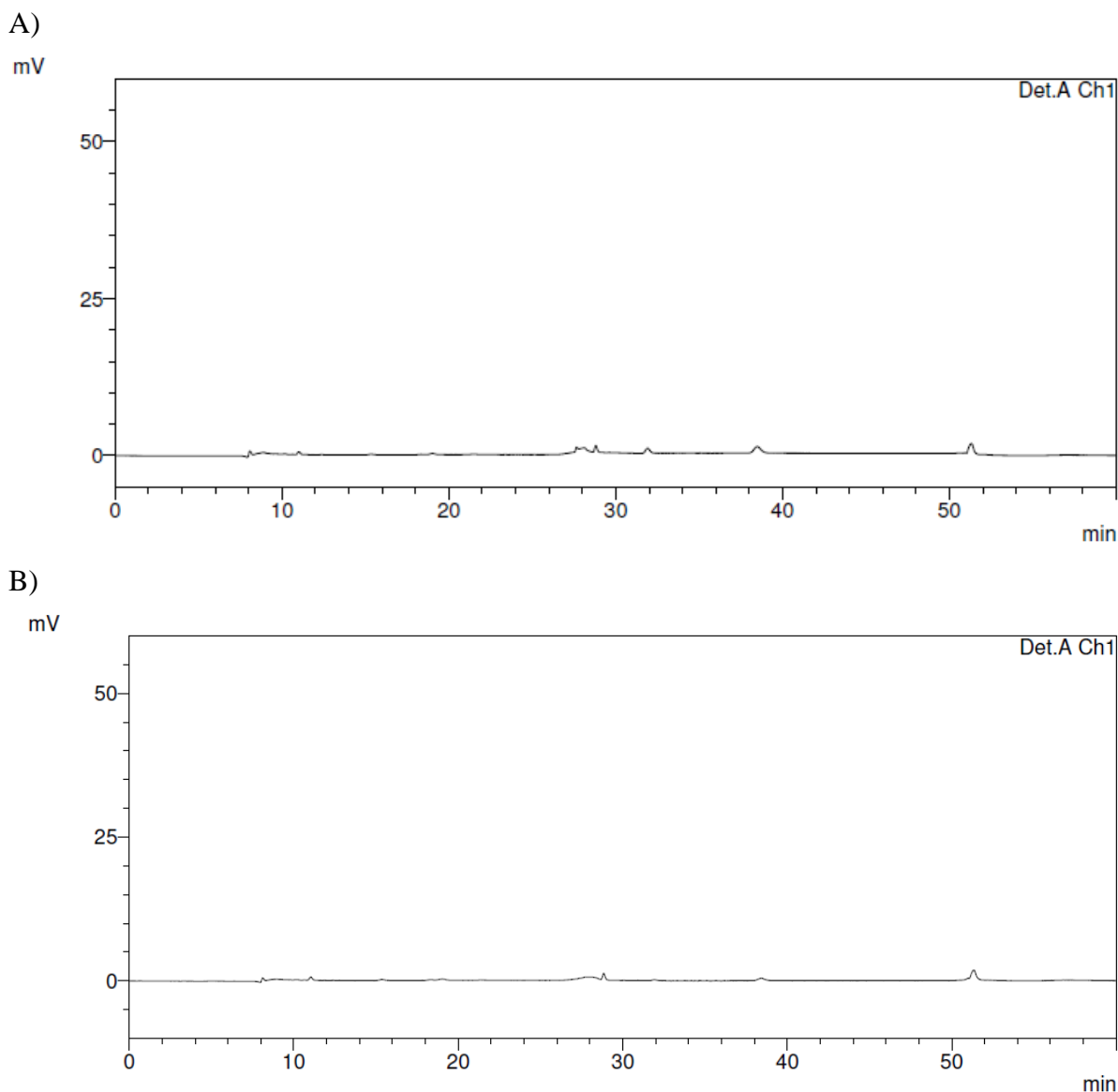
### 5.3.2. Padronização do método de CLAE para o estudo de penetração cutânea

#### 5.3.2.1. Seletividade: Pesquisa de interferentes

Os cromatogramas a seguir correspondem às análises do branco da solução receptora ressuspendida em tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) (Figura 39A), e das soluções extratoras contendo: fragmentos de E+D (Figura 39B), fita adesiva sem o EC (Figura 40A); e fita adesiva com o EC (Figura 40B). Esses cromatogramas mostram que a solução receptora utilizada, a fita adesiva e os constituintes da pele não interferiram na análise por CLAE.



**Figura 39** – Perfil cromatográfico da solução receptora ressuspensa em tetrahydrofurano:isopropanol (30:70) (A) e da solução extratora contendo fragmentos de E+D (B). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo:  $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; coluna de fase reversa C18, ( $5\mu\text{m}$ ),  $250\text{mm}\times 4\text{mm}$ ; detecção em 325 e 454nm.

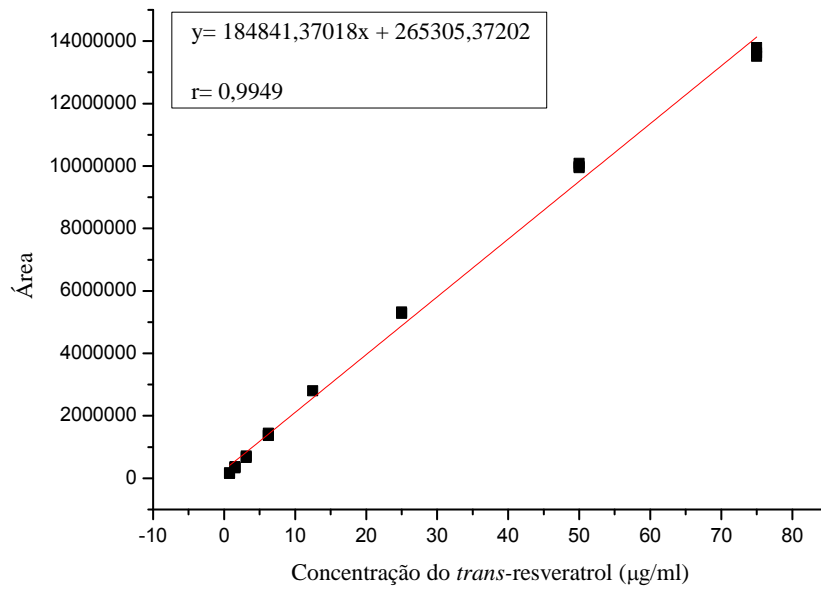


**Figura 40** – Perfil cromatográfico da solução extratora contendo fita adesiva (A) e da solução extratora contendo fita adesiva com o EC (B). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 39.

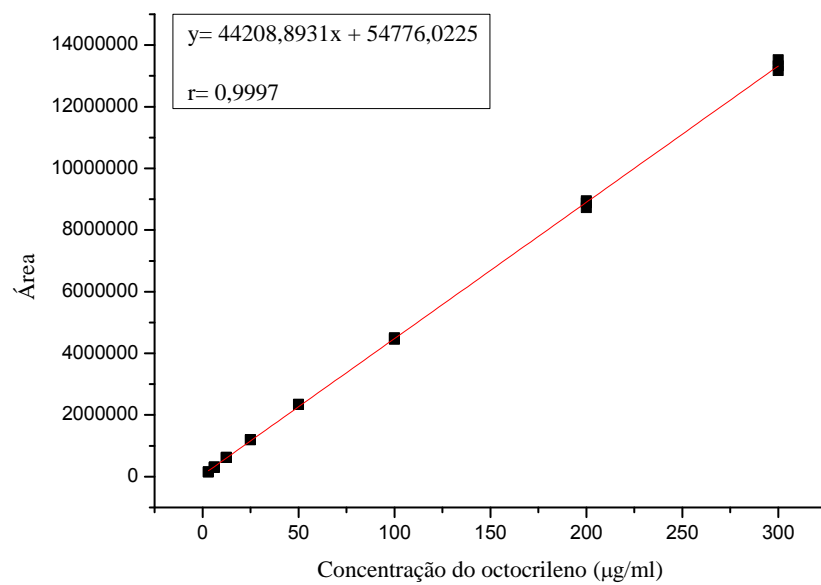
### 5.3.2.2. Linearidade

As curvas analíticas foram construídas a partir da análise dos dados obtidos por CLAE conforme descrito no item 4.2.4.6.2. Os gráficos de cada substância com suas respectivas equações da reta e coeficientes de correlação ( $r$ ) estão apresentados nas Figuras 41 a 43. Todas as substâncias apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99, o que nos permite afirmar que o método apresenta linearidade no intervalo de concentração avaliado (BRASIL, 2003).

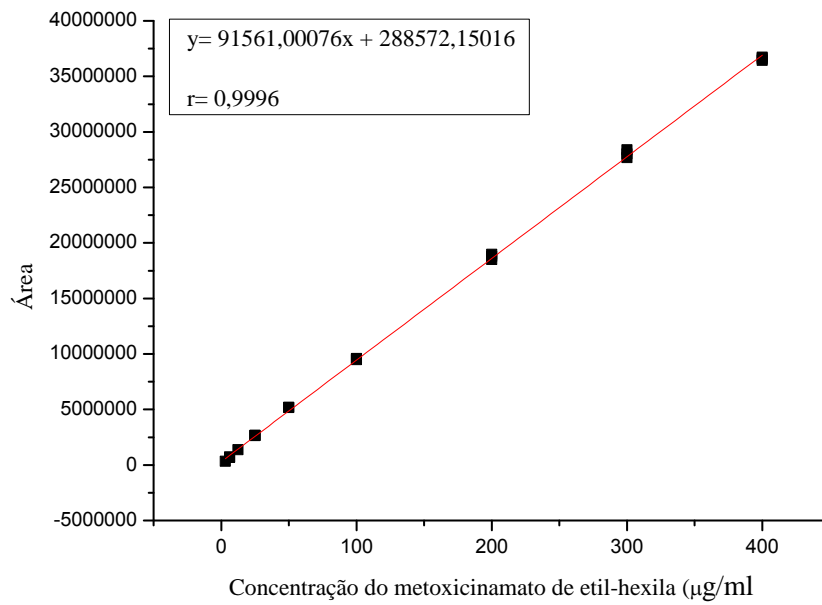
A)



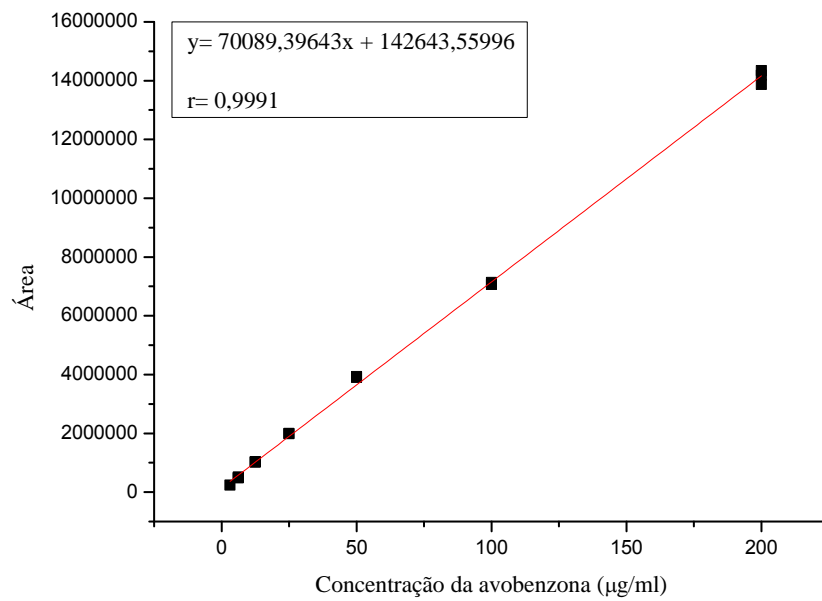
B)

**Figura 41** – Curvas analíticas do *trans*-resveratrol (A) e octocrileno (B).

A)

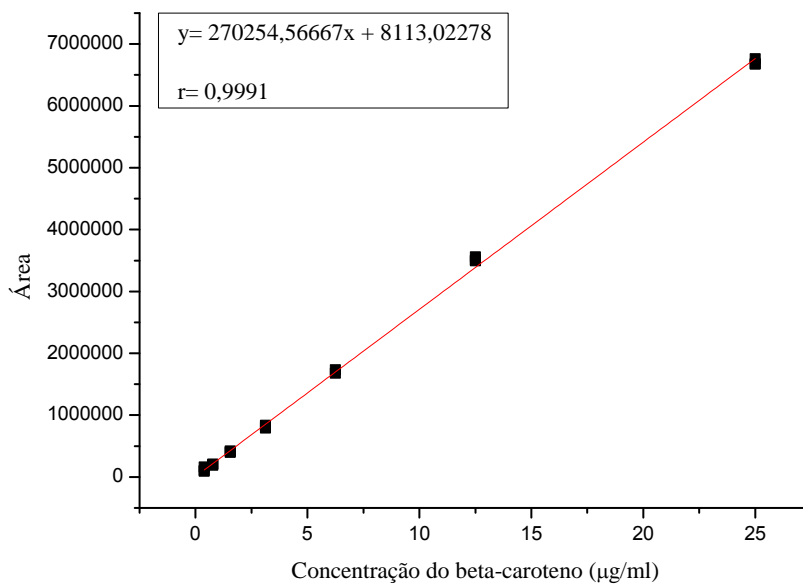


B)

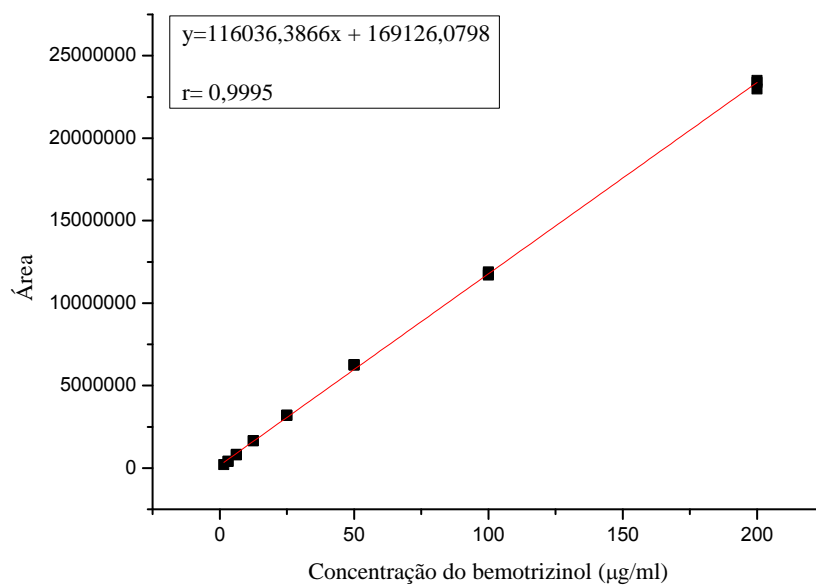


**Figura 42** – Curvas analíticas do metoxicinamato de etil-hexila (A) e avobenzona (B).

A)



B)

**Figura 43** – Curvas analíticas do beta-caroteno(A) e bemotrizinol (B).

### 5.3.2.3. Limite inferior de quantificação

Os resultados dos LIQs obtidos e intervalos de dosagem das substâncias em estudo estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** – Valores obtidos para os limites inferiores de quantificação (LIQ) e intervalos de dosagem das substâncias analisadas.

Padrão	LIQ - 5x resposta do branco (µg/mL)	LIQ - Precisão e exatidão (µg/mL)	Intervalo de dosagem (µg/mL)
<i>Trans-resveratrol</i>	0,69	0,742	0,742 - 75
Octocrileno	1,98	0,742	1,98 - 300
Metoxicinamato de etil-hexila	1,73	1,480	1,73 - 400
Avobenzona	2,00	0,093	2,00 - 200
Beta-caroteno	0,28	0,186	0,28 - 25
Bemotrizinol	1,10	0,093	1,10 - 100

A determinação do LIQ foi realizada com base na resposta do branco (5 vezes maior do que o ruído nas amostras de fluido receptor, E+D e EC) (Tabela 17), e também com base nos valores de exatidão (entre 80 e 120%) e precisão (< 20%) das substâncias em estudo (Tabelas 18 a 23), seguindo as recomendações da FDA (FDA, 2001).

**Tabela 17** – Dados de limite inferior de quantificação (LIQ) no fluido receptor, na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC) equivalente a 5 vezes resposta do branco.

Padrão	LIQ (µg/mL)		
	Fluido receptor	E+D	EC
<i>Trans-resveratrol</i>	0,06	0,14	0,69
Octocrileno	0,47	1,27	1,98
Metoxicinamato de etil-hexila	1,00	0,72	1,73
Avobenzona	1,15	1,00	2,00
Beta-caroteno	0,00	0,28	0,16
Bemotrizinol	0,69	1,10	1,08

**Tabela 18** – Dados de exatidão e precisão do *trans*-resveratrol.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,003		6,8	
0,046	-0,010	-132,0	-21,9	-23,3
0,046	-0,025		-54,6	
0,093	0,031		33,8	
0,093	0,025	11,3	27,4	31,4
0,093	0,031		33,2	
0,186	0,090		48,7	
0,186	0,111	14,0	59,9	57,6
0,186	0,119		64,3	
0,371	0,282		76,1	
0,371	0,296	4,2	79,6	79,5
0,371	0,307		82,7	
0,742	0,700		94,3	
0,742	0,656	4,1	88,4	90,1
0,742	0,650		87,5	
1,482	1,373		92,6	
1,482	1,384	1,6	93,4	93,8
1,482	1,415		95,5	
2,969	2,749		92,6	
2,969	2,821	2,2	95,0	94,7
2,969	2,869		96,6	
5,938	5,655		95,2	
5,938	5,701	0,9	96,0	96,1
5,938	5,758		97,0	
11,875	11,459		96,5	
11,875	11,340	0,5	95,5	96,1
11,875	11,419		96,2	
23,750	22,543		94,9	
23,750	22,421	2,3	94,4	93,5
23,750	21,620		91,0	



**Tabela 19** – Dados de exatidão e precisão do octocrileno.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,109		235,5	
0,046	0,142	13,4	306,4	268,0
0,046	0,122		262,2	
0,093	0,173		186,5	
0,093	0,205	12,3	220,8	194,1
0,093	0,162		175,1	
0,186	0,230		124,2	
0,186	0,253	5,1	136,3	132,0
0,186	0,251		135,5	
0,371	0,430		116,0	
0,371	0,520	15,9	140,2	138,7
0,371	0,594		160,0	
0,742	0,964		129,8	
0,742	0,757	13,6	102,0	112,4
0,742	0,781		105,3	
1,482	1,476		99,6	
1,482	1,511	2,6	102,0	102,2
1,482	1,556		105,0	
2,969	3,053		102,8	
2,969	3,132	1,8	105,5	104,9
2,969	3,160		106,5	
5,938	5,908		99,5	
5,938	5,977	1,0	100,7	100,6
5,938	6,025		101,5	
11,875	12,070		101,6	
11,875	11,665	1,7	98,2	99,8
11,875	11,823		99,6	
23,750	23,910		100,7	
23,750	23,273	3,5	98,0	97,5
23,750	22,282		93,8	

**Tabela 20** – Dados de exatidão e precisão do metoxicinamato de etil-hexila.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,420		906,0	
0,046	0,462	13,0	995,2	1022,9
0,046	0,542		1167,5	
0,093	0,684		737,2	
0,093	0,532	41,5	573,2	535,8
0,093	0,276		297,1	
0,186	0,338		182,2	
0,186	0,356	3,3	191,7	189,3
0,186	0,360		194,1	
0,371	0,517		139,4	
0,371	0,516	20,1	139,0	157,5
0,371	0,720		194,0	
0,742	1,157		156,0	
0,742	0,790	23,8	106,4	122,4
0,742	0,777		104,8	
1,482	1,452		97,9	
1,482	1,475	2,1	99,5	99,9
1,482	1,514		102,2	
2,969	2,767		93,2	
2,969	2,853	3,1	96,1	96,2
2,969	2,945		99,2	
5,938	5,488		92,4	
5,938	5,582	1,2	94,0	93,7
5,938	5,611		94,5	
11,875	11,187		94,2	
11,875	10,981	0,9	92,5	93,2
11,875	11,052		93,1	
23,750	22,179		93,4	
23,750	22,499	2,5	94,7	92,8
23,750	21,426		90,2	

**Tabela 21** – Dados de exatidão e precisão da avobenzone.

Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,061		131,7	
0,046	0,043	32,5	92,8	97,8
0,046	0,032		68,8	
0,093	0,078		83,9	
0,093	0,080	1,3	86,1	85,1
0,093	0,079		85,3	
0,186	0,131		70,7	
0,186	0,161	11,7	86,8	81,7
0,186	0,162		87,5	
0,371	0,312		84,0	
0,371	0,321	7,0	86,4	88,7
0,371	0,355		95,7	
0,742	0,717		96,6	
0,742	0,681	3,1	91,8	93,3
0,742	0,679		91,5	
1,482	1,373		92,7	
1,482	1,371	0,5	92,5	92,8
1,482	1,384		93,4	
2,969	2,635		88,7	
2,969	2,668	1,4	89,9	90,0
2,969	2,709		91,3	
5,938	5,119		86,2	
5,938	5,117	0,6	86,2	86,5
5,938	5,174		87,1	
11,875	10,292		86,7	
11,875	10,063	1,1	84,7	85,7
11,875	10,190		85,8	
23,750	20,171		84,9	
23,750	20,337	0,4	85,6	85,3
23,750	20,292		85,4	

**Tabela 22** – Dados de exatidão e precisão do beta-caroteno.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,049		104,7	
0,046	0,037	38,4	80,6	77,0
0,046	0,021		45,8	
0,093	0,068		73,8	
0,093	0,069	9,0	74,5	78,3
0,093	0,080		86,4	
0,186	0,130		70,3	
0,186	0,153	12,9	82,6	81,4
0,186	0,169		91,2	
0,371	0,320		86,1	
0,371	0,331	2,7	89,1	88,7
0,371	0,337		90,9	
0,742	0,746		100,5	
0,742	0,701	3,9	94,4	96,2
0,742	0,695		93,6	
1,482	1,445		97,5	
1,482	1,412	1,4	95,3	96,0
1,482	1,411		95,2	
2,969	2,799		94,3	
2,969	2,879	2,0	97,0	96,4
2,969	2,910		98,0	
5,938	5,866		98,8	
5,938	5,950	1,1	100,2	100,0
5,938	6,000		101,1	
11,875	12,285		103,5	
11,875	12,196	0,4	102,7	103,2
11,875	12,289		103,5	
23,750	24,494		103,1	
23,750	25,180	2,4	106,0	103,4
23,750	23,986		101,0	

**Tabela 23** – Dados de exatidão e precisão do bemotrizinol.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Precisão	Exatidão	Exatidão média
0,046	0,062		133,1	
0,046	0,062	39,8	132,7	108,1
0,046	0,027		58,4	
0,093	0,083		89,1	
0,093	0,079	2,7	85,0	86,4
0,093	0,079		85,3	
0,186	0,144		77,8	
0,186	0,159	12,2	85,7	87,4
0,186	0,183		98,8	
0,371	0,335		90,1	
0,371	0,340	4,8	91,7	93,4
0,371	0,366		98,5	
0,742	0,753		101,5	
0,742	0,713	3,7	96,1	97,4
0,742	0,702		94,6	
1,482	1,436		96,9	
1,482	1,463	2,1	98,7	98,9
1,482	1,498		101,1	
2,969	3,152		106,2	
2,969	3,194	2,0	107,6	108,1
2,969	3,280		110,5	
5,938	5,965		100,5	
5,938	6,048	1,2	101,9	101,8
5,938	6,114		103,0	
11,875	11,865		99,9	
11,875	11,688	0,8	98,4	99,3
11,875	11,829		99,6	
23,750	24,054		101,3	
23,750	23,001	4,2	96,8	97,1
23,750	22,109		93,1	

#### 5.3.2.4. Análise da recuperação

A Tabela 24 corresponde aos valores de recuperação das substâncias em estudo, obtidos pela análise das amostras de E+D e de EC acrescidas com concentrações conhecidas das substâncias analisadas.

**Tabela 24** – Recuperação dos filtros solares e antioxidantes em estudo em amostras de pele.

Padrão	Concentração teórica (µg/mL)	Estrato córneo (EC)		Epiderme + derme (E+D)	
		Concentração experimental média ± DP (µg/mL)	Recuperação (%)	Concentração experimental média ± DP (µg/mL)	Recuperação (%)
<i>Trans</i> -resveratrol	3,33	2,93 ± 0,28	88,0	3,26 ± 0,14	97,8
Octocrileno	13,33	13,97 ± 1,68	104,8	15,30 ± 0,55	114,7
Metoxicinamato de etil-hexila	13,33	14,96 ± 2,48	112,2	15,31 ± 0,59	114,8
Avobenzona	13,33	13,79 ± 0,97	103,4	15,03 ± 0,57	112,7
Beta-caroteno	1,67	1,00 ± 0,16	59,8	1,91 ± 0,05	114,7
Bemotrizinol	13,33	11,23 ± 0,66	84,2	15,13 ± 0,60	113,5

#### 5.3.3. Penetração cutânea

Os resultados obtidos após análise das soluções receptoras das células que receberam as formulações F2F, F2R, F2B e F2RB mostraram que provavelmente não houve permeação de nenhuma das substâncias em estudo, uma vez que não foi possível detectá-las, mesmo que as amostras tenham sido concentradas três vezes (Tabela 25).

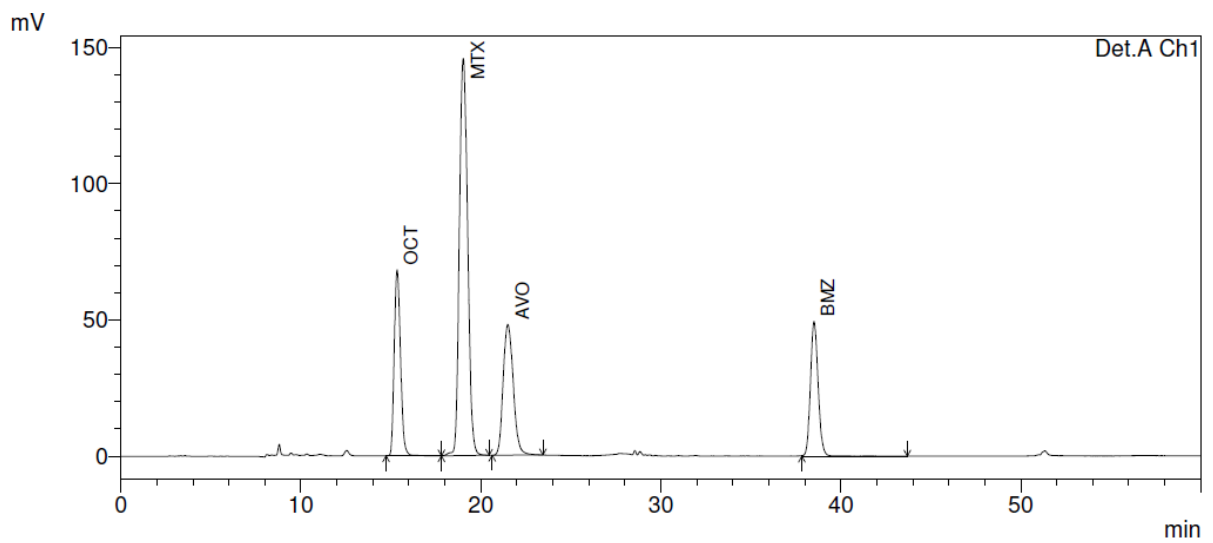
**Tabela 25** – Concentração das substâncias em estudo (µg/cm<sup>2</sup>) presentes na solução receptora (n=6, ND = não detectável).

Substância	Concentração (µg/cm <sup>2</sup> )			
	F2F	F2R	F2B	F2RB
<i>Trans</i> -resveratrol	ND	ND	ND	ND
Octocrileno	ND	ND	ND	ND
Metoxicinamato de etil-hexila	ND	ND	ND	ND
Avobenzona	ND	ND	ND	ND
Beta-caroteno	ND	ND	ND	ND
Bemotrizinol	ND	ND	ND	ND

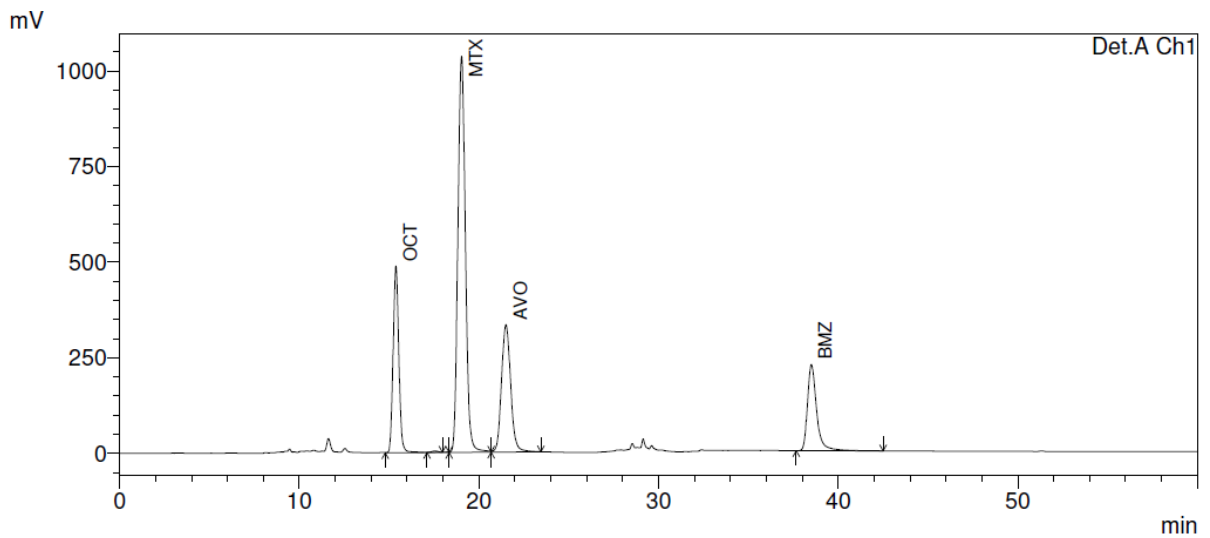
As Figuras 44 a 47 representam os cromatogramas das amostras de E+D e EC expostas às formulações avaliadas, ou seja, F2F, F2R, F2B, F2RB.

A concentração das substâncias retidas no EC e na E+D após aplicação das formulações estudadas na pele de orelha de porco estão apresentadas nas Tabelas 26 a 31 e Figuras 48 a 50, e a distribuição dessas substâncias nas diferentes camadas da pele está apresentada na Tabela 32 e na Figura 51.

A)



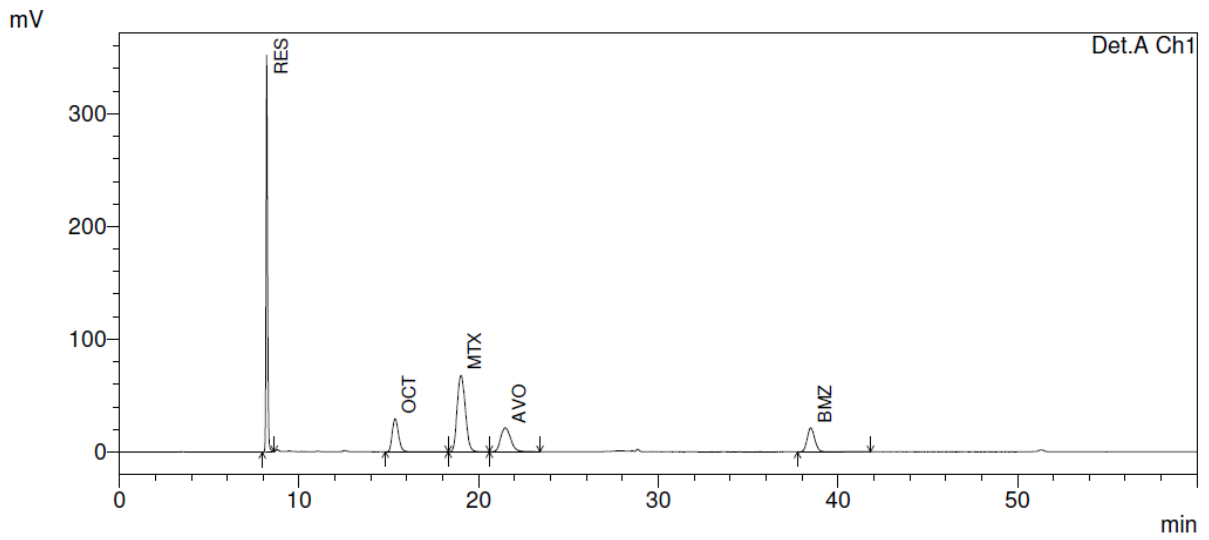
B)



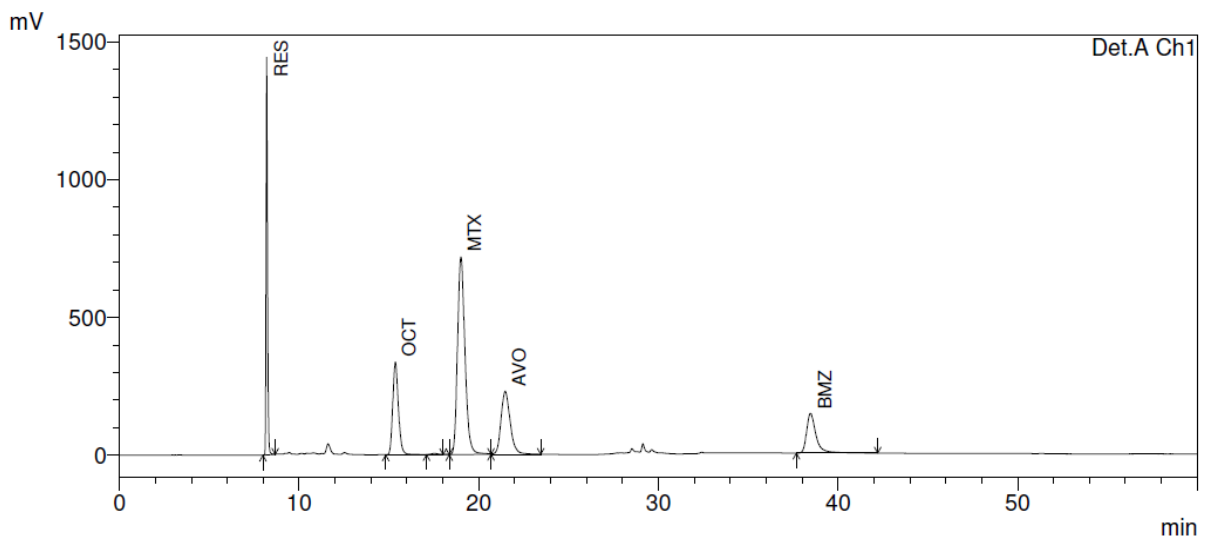
**Figura 44** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2F por 12 horas. Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético; fluxo:  $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; coluna de fase reversa C18, (5 $\mu\text{m}$ ), 250mm $\times$ 4mm; detecção em 325 nm.



A)

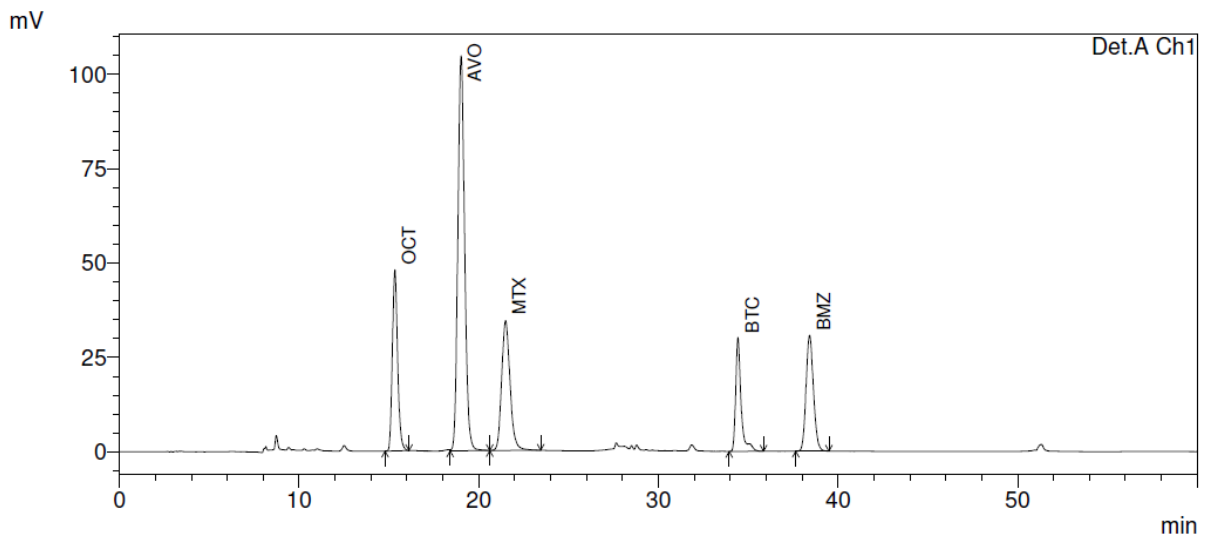


B)

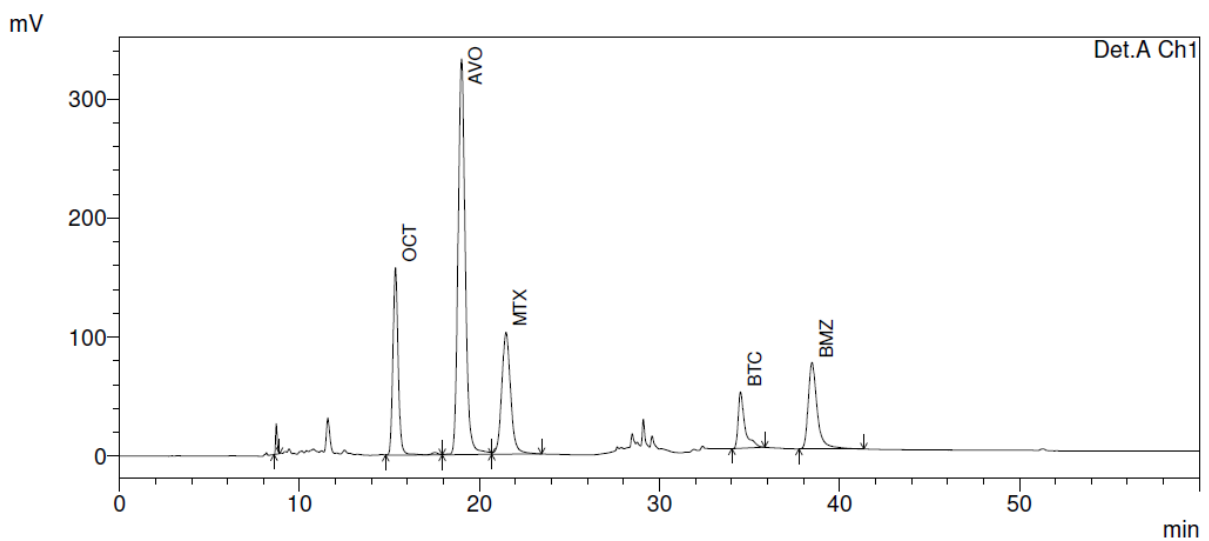


**Figura 45** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2R por 12 horas. Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMZ). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44.

A)

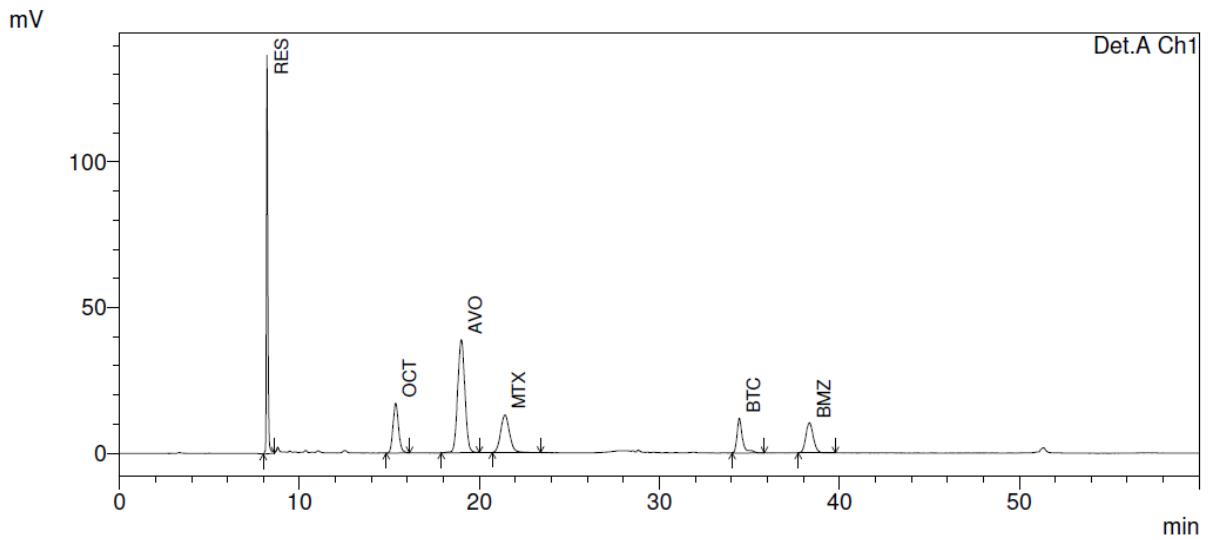


B)

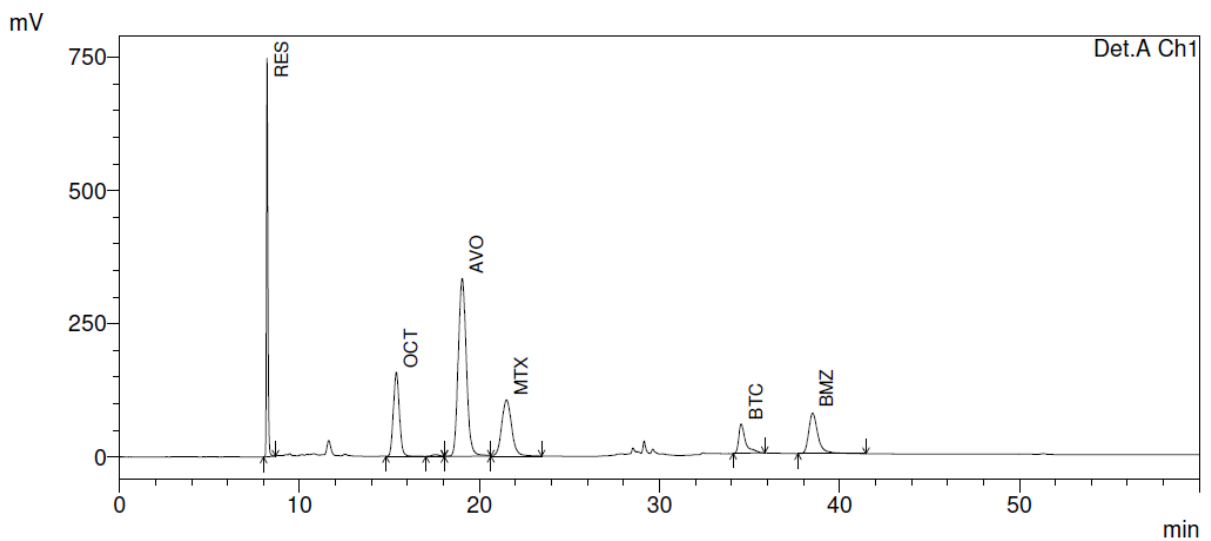


**Figura 46** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2B por 12 horas. Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), bemotrizinol (BMZ) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44.

A)



B)



**Figura 47** – Cromatogramas referentes às amostras de E+D (A) e de EC (B) expostas à formulação F2RB por 12 horas. Picos: *trans*-resveratrol (RES), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etil-hexila (MTX), avobenzona (AVO), bemotrizinol (BMZ) e beta-caroteno. Condições cromatográficas conforme descrito na Figura 44.

**Tabela 26** – Concentração de *trans*-resveratrol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2R	3,49	3,18 $\pm$ 0,78	22,23	22,97 $\pm$ 3,10	25,72	26,15 $\pm$ 3,09
	3,92		25,68		29,60	
	3,51		19,21		22,72	
	3,08		26,97		30,05	
	1,69		23,86		25,55	
	3,36		19,90		23,26	
F2RB	0,75	1,00 $\pm$ 0,32	6,23	8,40 $\pm$ 2,40	6,98	9,40 $\pm$ 2,66
	0,75		6,64		7,38	
	0,77		6,32		7,09	
	1,49		9,63		11,12	
	0,95		9,46		10,41	
	1,28		12,14		13,42	

**Tabela 27** – Concentração de beta-caroteno ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2B	0,78	0,65 $\pm$ 0,17	4,62	3,12 $\pm$ 0,90	5,41	3,77 $\pm$ 0,99
	0,73		2,70		3,42	
	0,42		3,26		3,68	
	0,44		2,05		2,49	
	0,78		3,49		4,27	
	0,76		2,56		3,32	
F2RB	0,45	0,36 $\pm$ 0,10	1,24	1,88 $\pm$ 0,58	1,69	2,23 $\pm$ 0,62
	0,25		1,32		1,57	
	0,26		1,53		1,80	
	0,49		2,28		2,77	
	0,31		2,26		2,56	
	0,39		2,63		3,01	

**Tabela 28** – Concentração de metoxicinamato de etil-hexila ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2F	10,95	7,60 $\pm$ 2,35	95,92	128,21 $\pm$ 35,31	106,87	135,81 $\pm$ 35,98
	4,33		85,88		90,21	
	7,30		125,33		132,63	
	7,88		137,59		145,47	
	5,90		140,10		146,00	
	9,25		184,43		193,69	
F2R	7,89	6,77 $\pm$ 1,85	124,46	128,82 $\pm$ 36,00	132,35	135,58 $\pm$ 37,40
	7,16		139,61		146,78	
	6,88		94,59		101,47	
	9,36		194,16		203,51	
	4,89		120,00		124,89	
	4,42		100,08		104,50	
F2B	6,28	6,95 $\pm$ 1,76	72,36	53,28 $\pm$ 12,33	78,64	60,23 $\pm$ 11,59
	6,38		45,78		52,16	
	4,24		61,36		65,60	
	7,05		42,27		49,33	
	9,10		41,34		50,44	
	8,62		56,57		65,18	
F2RB	2,91	3,37 $\pm$ 1,01	37,47	42,36 $\pm$ 12,02	40,38	45,74 $\pm$ 12,45
	2,28		32,83		35,12	
	3,27		28,53		31,80	
	5,23		46,32		51,55	
	2,94		47,28		50,22	
	3,60		61,75		65,36	

**Tabela 29** – Concentração de avobenzona ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2F	5,22	3,78 $\pm$ 1,14	44,61	65,60 $\pm$ 20,22	49,83	69,37 $\pm$ 20,56
	2,12		43,24		45,37	
	3,68		64,25		67,93	
	4,02		70,87		74,88	
	2,92		73,10		76,02	
	4,70		97,52		102,22	
F2R	3,93	3,39 $\pm$ 0,93	63,99	66,43 $\pm$ 19,40	67,92	69,82 $\pm$ 20,15
	3,52		72,26		75,78	
	3,34		48,43		51,77	
	4,80		101,83		106,63	
	2,48		60,95		63,43	
	2,30		51,11		53,40	
F2B	2,87	3,27 $\pm$ 1,05	36,38	26,52 $\pm$ 6,42	39,26	27,79 $\pm$ 6,39
	2,84		22,00		24,85	
	2,76		30,78		33,54	
	2,03		20,92		22,95	
	4,76		20,58		25,34	
	4,36		28,45		32,82	
F2RB	1,49	1,62 $\pm$ 0,50	18,63	21,20 $\pm$ 6,23	20,12	22,81 $\pm$ 6,52
	0,99		16,25		17,24	
	1,42		14,04		15,46	
	2,49		23,24		25,73	
	1,48		23,78		25,26	
	1,83		31,25		33,08	

**Tabela 30** – Concentração de octocrileno ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2F	8,30		71,01		79,31	
	3,46		63,04		66,51	
	5,76	5,77 $\pm$ 1,75	93,54	95,77 $\pm$ 27,21	99,29	101,54 $\pm$ 27,61
	6,04		103,01		109,06	
	4,23		104,92		109,15	
	6,84		139,10		145,94	
F2R	6,07		93,20		99,27	
	5,43		105,14		110,57	
	5,08	5,19 $\pm$ 1,30	70,59	96,14 $\pm$ 26,28	75,67	101,33 $\pm$ 27,84
	7,04		144,41		151,45	
	3,88		89,20		93,09	
	3,62		74,31		77,92	
F2B	4,85		53,37		58,22	
	4,58		33,04		37,61	
	3,72	5,02 $\pm$ 1,48	45,19	39,05 $\pm$ 9,27	48,91	44,07 $\pm$ 9,19
	3,40		30,98		34,38	
	7,07		30,14		37,21	
	6,52		41,54		48,07	
F2RB	2,72		27,26		29,98	
	1,77		23,82		25,59	
	3,36	2,93 $\pm$ 0,93	21,00	31,15 $\pm$ 9,06	24,35	34,09 $\pm$ 9,25
	4,50		34,13		38,63	
	2,38		34,89		37,27	
	2,87		45,82		48,70	

**Tabela 31** – Concentração de bemotrizinol ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Formulação	Epiderme/derme (E+D)		Estrato córneo (EC)		Pele total [(E+D) + EC]	
	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentração média ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
F2F	2,03	1,51 $\pm$ 0,47	20,56	27,26 $\pm$ 6,72	22,58	28,77 $\pm$ 6,87
	0,85		21,15		22,00	
	1,58		25,42		27,01	
	1,67		28,77		30,44	
	1,02		28,78		29,80	
	1,89		38,91		40,80	
F2R	1,64	1,37 $\pm$ 0,42	24,02	26,00 $\pm$ 7,81	25,66	27,36 $\pm$ 8,12
	1,45		27,01		28,46	
	1,34		18,77		20,11	
	1,97		40,72		42,69	
	0,93		24,93		25,86	
	0,86		20,53		21,39	
F2B	1,35	1,44 $\pm$ 0,43	16,43	11,28 $\pm$ 3,13	17,78	12,72 $\pm$ 3,12
	1,14		9,34		10,48	
	1,14		12,89		14,04	
	1,06		8,38		9,44	
	2,08		8,61		10,69	
	1,87		12,02		13,89	
F2RB	0,65	0,56 $\pm$ 0,13	6,74	8,06 $\pm$ 2,60	7,39	8,63 $\pm$ 2,60
	0,52		5,57		6,09	
	0,54		5,56		6,10	
	0,76		8,99		9,76	
	0,38		9,31		9,69	
	0,53		12,21		12,74	



**Tabela 32** – Porcentagem dos filtros solares e antioxidantes encontrada nas camadas da pele 12 horas após aplicação das diferentes formulações estudadas.

Padrão	Concentração teórica em 250 mg de formulação ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Epiderme + derme (E+D)				Estrato córneo (EC)			
		Porcentagem média $\pm$ DP				Porcentagem média $\pm$ DP			
		F2F	F2R	F2B	F2RB	F2F	F2R	F2B	F2RB
<i>Trans</i> -resveratrol	1412,43	-	0,22 $\pm$ 0,06	-	0,07 $\pm$ 0,02	-	1,63 $\pm$ 0,22	-	0,59 $\pm$ 0,17
Octocrileno	8474,58	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,32	1,13 $\pm$ 0,32	0,46 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,11
Metoxicinamato de etil-hexila	11299,44	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,31	1,14 $\pm$ 0,32	0,47 $\pm$ 0,12	0,37 $\pm$ 0,11
Avobenzona	5649,72	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,36	1,18 $\pm$ 0,34	0,47 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,11
Beta-caroteno	847,46	-	-	0,08 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	-	-	0,37 $\pm$ 0,11	0,22 $\pm$ 0,07
Bemotrizinol	2824,86	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,24	0,92 $\pm$ 0,28	0,40 $\pm$ 0,11	0,29 $\pm$ 0,09

A análise de variância (ANOVA) dos resultados do estudo de retenção cutânea das substâncias presentes na pele, após aplicação das formulações F2F, F2R, F2B e F2RB, mostrou que a quantidade dos filtros solares e antioxidantes em estudo retidos no EC foi estatisticamente maior do que a encontrada na E+D (Figuras 48, 49 e 50).

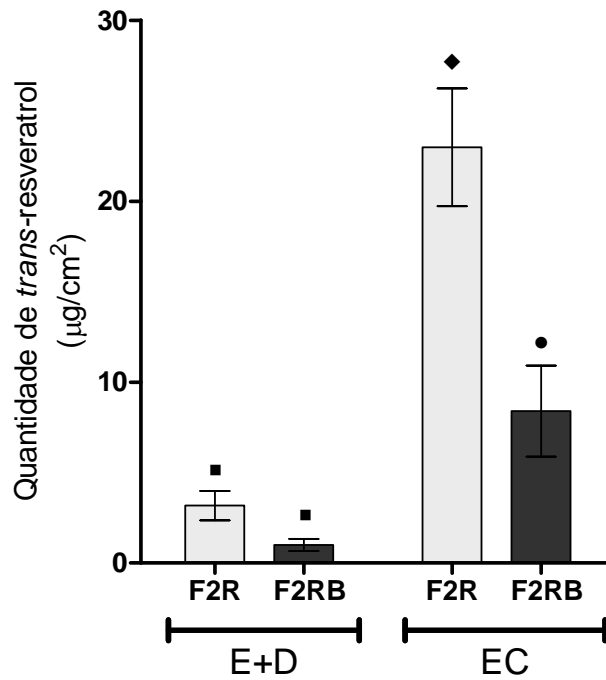
Quando o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno foram utilizados em combinação (F2RB), foi observado que a quantidade desses antioxidantes retida no EC foi estatisticamente inferior ao encontrado nessa mesma camada da pele quando essas substâncias foram utilizadas separadamente (F2R e F2B) ( $p < 0,001$ ) (Figura 48).

Também foi observado que o beta-caroteno, quando utilizado separadamente (F2B) ou em combinação com o *trans*-resveratrol (F2RB), provocou redução estatisticamente significativa da retenção no EC de todos os filtros solares avaliados, quando comparados com os valores obtidos após aplicação das formulações F2F e F2R (Figuras 49 e 50) ( $p < 0,001$ ).

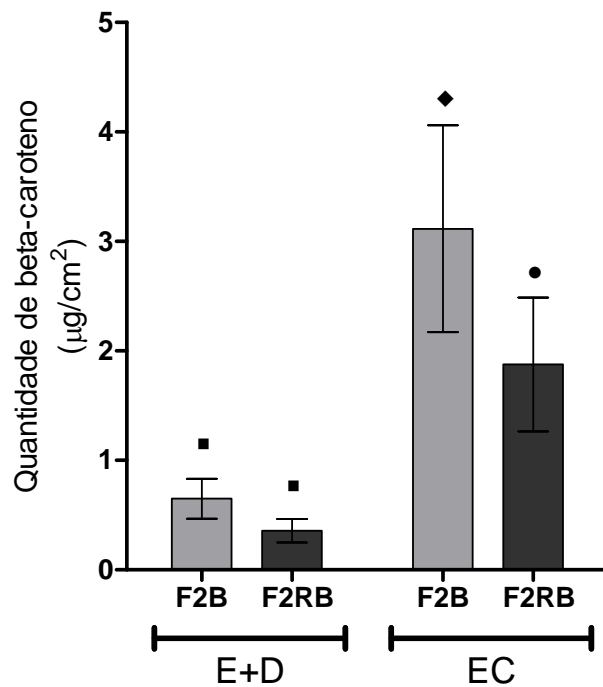
O estudo de retenção cutânea mostrou que, em todas as formulações, uma pequena porcentagem da dose total aplicada dos antioxidantes (0,04 a 0,22% na E+D; e 0,22 a 1,63% no EC) e dos filtros solares em estudo (0,02 a 0,07% na E+D; e 0,29 a 1,18% no EC) ficou retida na pele (Figura 51 e Tabela 32).

A análise da distribuição das substâncias em estudo, na E+D e no EC, mostrou que os filtros solares e os antioxidantes ficaram majoritariamente retidos no EC, sendo que, após aplicação de todas as formulações avaliadas, mais de 80% dos antioxidantes e mais de 90% dos filtros solares retidos na pele foi restrita ao EC (Figura 51).

A)

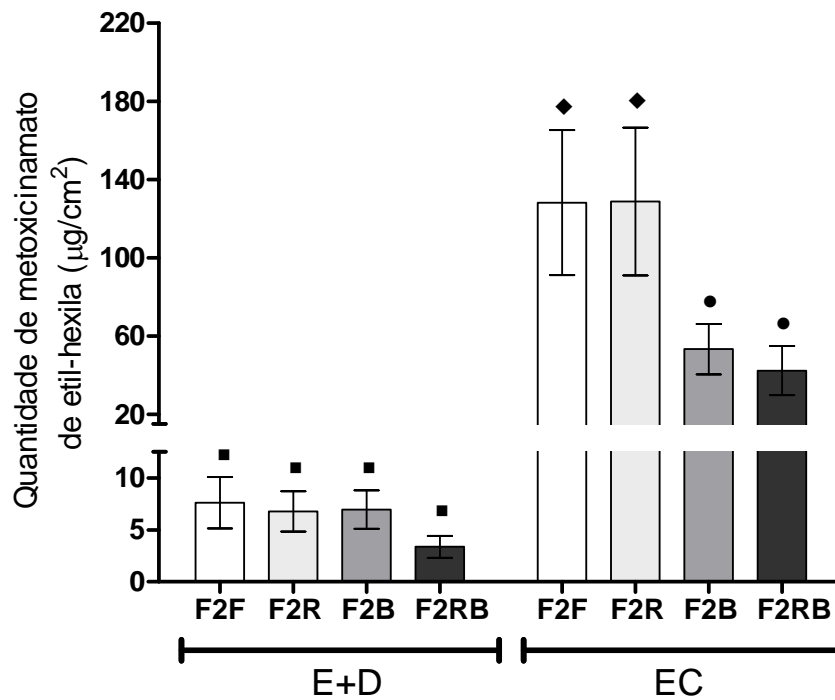


B)

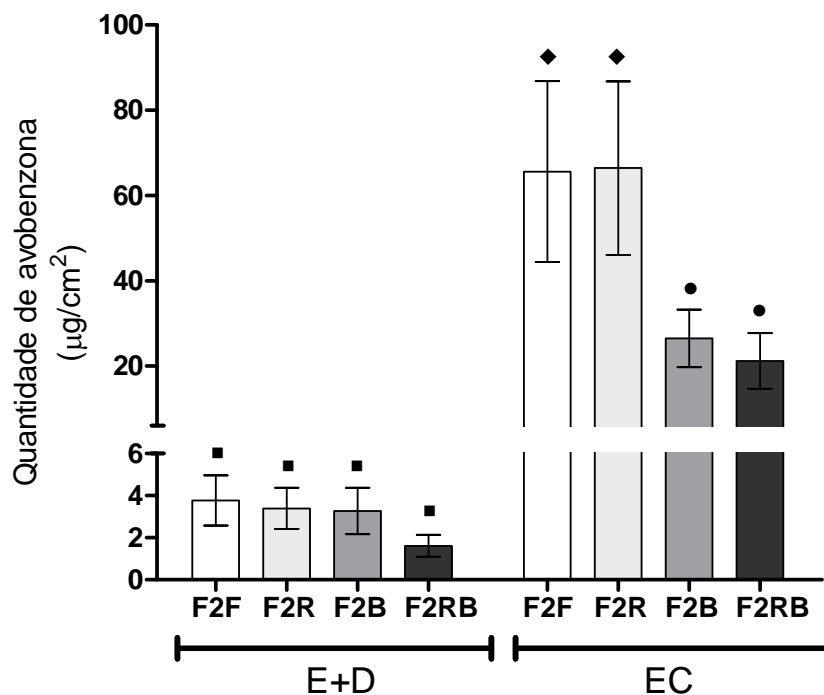


**Figura 48** – Concentração de *trans*-resveratrol (A) e de beta-caroteno (B) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA,  $n=6$  (média e intervalo de confiança 95%). Símbolos diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,001$ ).

A)

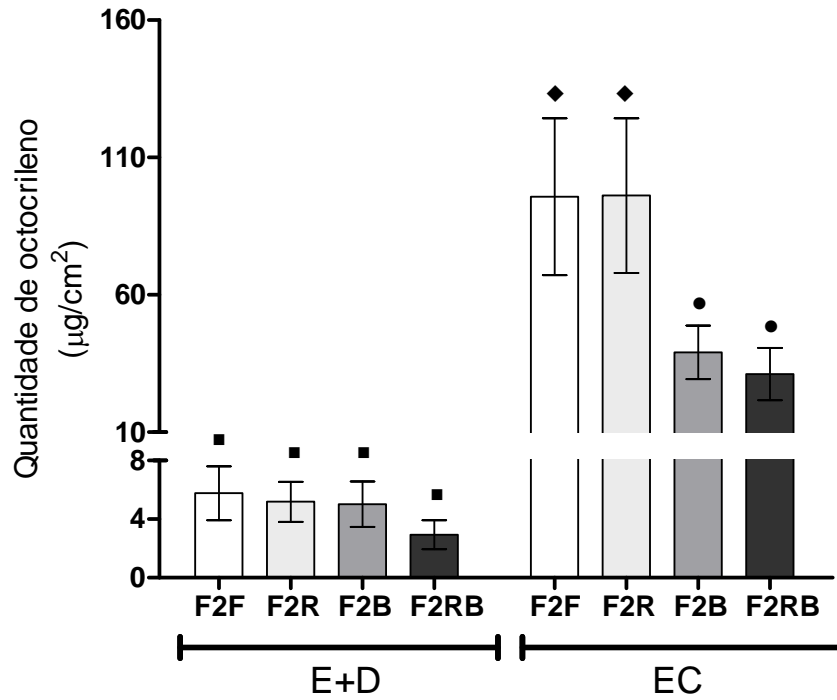


B)

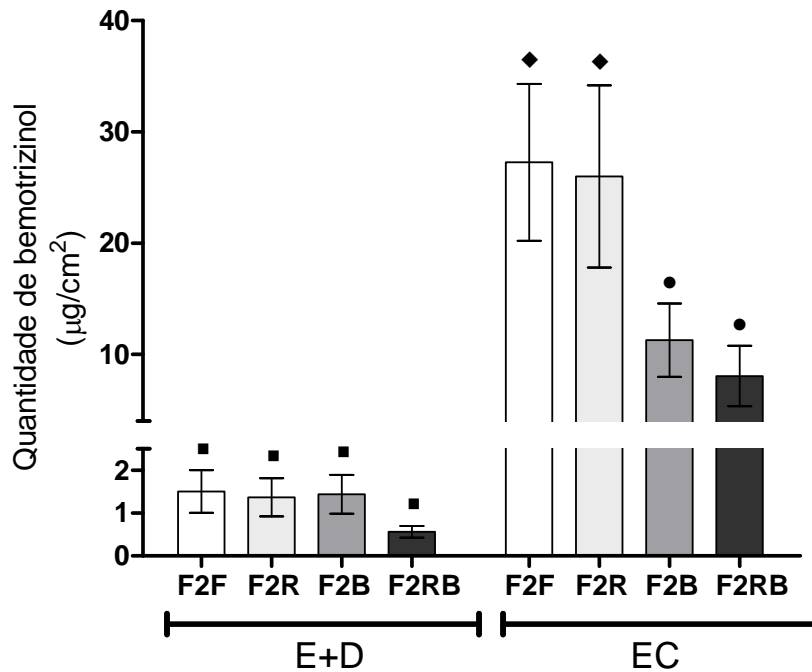


**Figura 49** – Concentração de metoxicinamato de etil-hexila (A) e de avobenzona (B) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA,  $n=6$  (média e intervalo de confiança 95%). Símbolos diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,001$ ).

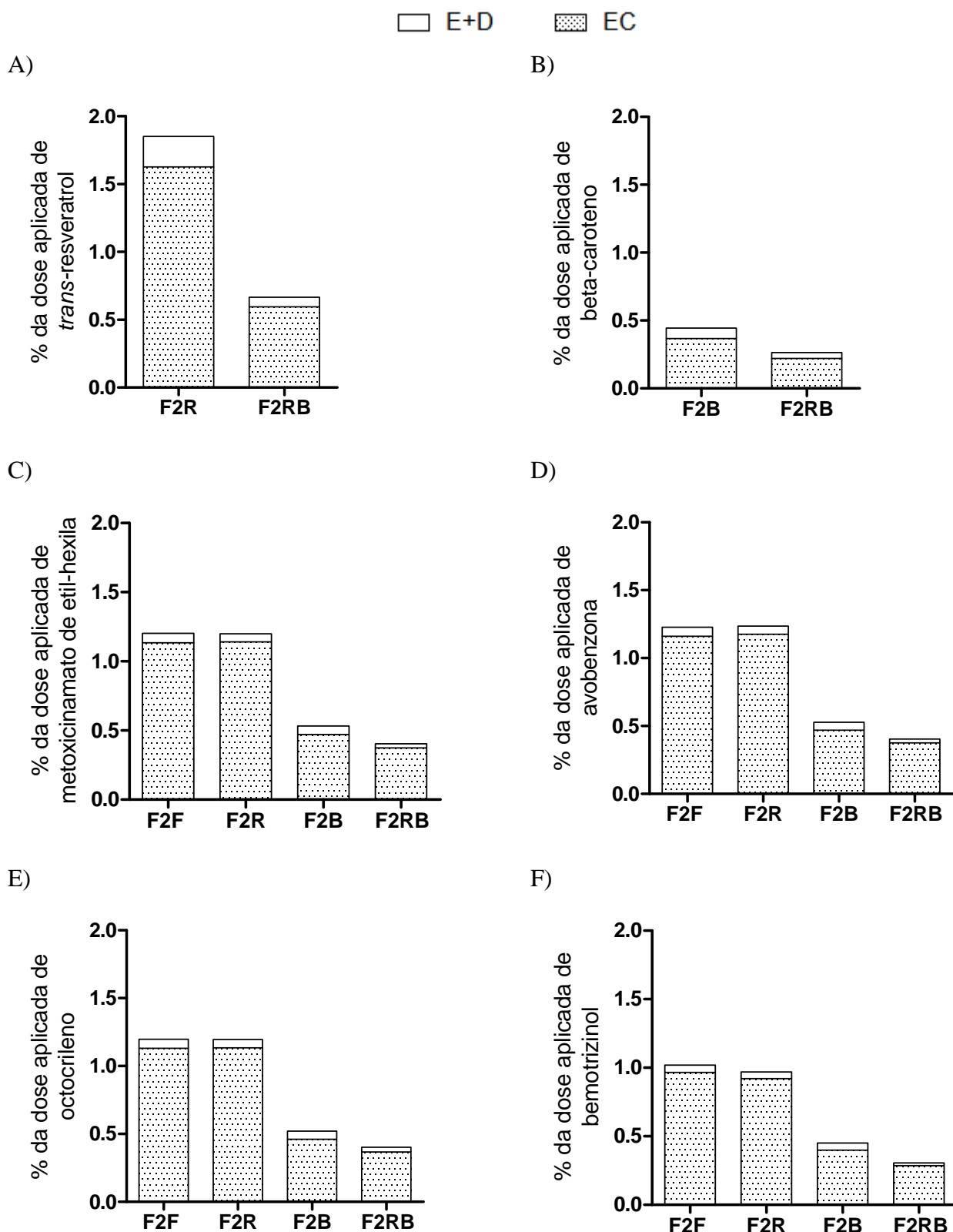
A)



B)



**Figura 50** – Concentração de octocrieno (A) e de bemotrizinol (B) ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) encontrada na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB). ANOVA,  $n=6$  (média e intervalo de confiança 95%). Símbolos diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p<0,001$ ).



**Figura 51** – Distribuição das substâncias em estudo na epiderme + derme (E+D) e no estrato córneo (EC), 12 horas após aplicação das formulações estudadas contendo: filtros solares (F2F), filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol (F2R), filtros solares acrescidos de beta-caroteno (F2B) e filtros solares acrescidos de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2RB) (% com relação ao total aplicado, ou seja, 250mg de formulação). **(A)**: *Trans*-resveratrol. **(B)**: Beta-caroteno. **(C)**: Metoxicinamato de etil-hexila. **(D)**: Avobenzona. **(E)**: Octocrileno. **(F)**: Bemotrizinol.

## ***6. Discussão***

Os fotoprotetores devem proporcionar proteção efetiva contra os raios UV e não oferecer riscos à saúde do consumidor. Nesse contexto é necessário que os fotoprotetores possuam um balanço adequado de filtros UVA e UVB, e também que as substâncias utilizadas no seu desenvolvimento apresentem as características ideais quanto à fotoestabilidade e à penetração cutânea. Assim, o estudo da fotoestabilidade e da penetração cutânea de filtros solares e antioxidantes em formulações fotoprotetoras têm grande relevância no desenvolvimento de novas formulações.

A utilização de substâncias naturais, tais como polifenóis e carotenóides, em formulações cosméticas está em crescente evidência atualmente em virtude do seu potencial fotoprotetor. O *trans*-resveratrol e o beta-caroteno têm sido amplamente estudados por pesquisadores a fim de elucidar suas propriedades biológicas e mecanismos de ação, bem como sua utilização em formulações cosméticas devido, principalmente, às suas já conhecidas propriedades antioxidante, e, ainda, antiinflamatória, no caso do *trans*-resveratrol. No entanto, ainda há pouca informação quanto à segurança e estabilidade desses compostos em formulações fotoprotetoras. Adicionalmente, até o momento não há na literatura dados disponíveis sobre a fotoestabilidade e penetração cutânea de filtros solares combinados com o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno.

Para selecionar os filtros solares a serem utilizados, foram realizadas pesquisas de mercado e em literatura técnico-científica visando o desenvolvimento de um fotoprotetor com FPS em torno de 30. Considerando que a fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes, bem como da formulação final podem ser alterados dependendo da combinação de moléculas ativas utilizada, o presente trabalho avaliou três associações diferentes de filtros solares. As três associações de filtros solares selecionadas apresentavam a combinação octocrileno + avobenzona + metoxicinamato de etil-hexila, a qual está presente em diversos fotoprotetores disponíveis no mercado. Além disso, uma das associações apresentava bemotrizinol, que tem importante efeito fotoestabilizador sobre a combinação avobenzona + metoxicinamato de etil-hexila (CHATELAIN; GABARD, 2001), e a outra apresentava octiltriazone, cujos efeitos sobre a fotoestabilidade da combinação octocrileno + avobenzona + metoxicinamato de etil-hexila ainda não são conhecidos. Além disso, tanto o bemotrizinol quanto a octiltriazone apresentam elevado peso molecular (> 500 Daltons), o que representa uma vantagem sobre a segurança das formulações (TUCHINDA, 2006).

Em virtude da falta de informações sobre a estabilidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares, *trans*-resveratrol e beta-caroteno, neste trabalho, foram desenvolvidas formulações com quatro diferentes bases autoemulsificantes com o propósito



de selecionar a base que apresentasse o melhor resultado nos testes preliminares de estabilidade. Todas as bases autoemulsificantes foram combinadas à duas associações de filtros solares em estudo (2 e 3), as quais continham um balanço adequado de filtros solares UVA e UVB, que teoricamente resultou em um amplo espectro de proteção solar (*BASF Sunscreen Simulator*, 2011).

A seleção das bases autoemulsificantes foi realizada através de pesquisa em literatura técnico-científica, sendo que todas as bases avaliadas são adequadas para o desenvolvimento de formulações destinadas a cuidados com a pele, incluindo fotoprotetores. Segundo a literatura técnica, a base autoemulsificante A suporta grandes quantidades de fase oleosa, característica essencial quando se utilizam filtros lipossolúveis, e proporciona grande estabilidade às formulações, inclusive em ampla faixa de temperatura e de pH, e também apresenta boa compatibilidade com a pele.

Para elaboração das formulações também foram selecionados: um *blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e emulsificantes, cujo polímero presente em sua composição não sofre alteração após exposição ao UV, visando o aumento da viscosidade e da estabilidade, e um *blend* de emolientes e silicone, com o objetivo de melhorar o sensorial das formulações.

Após a seleção dos antioxidantes, dos filtros solares e dos excipientes a serem utilizados nas formulações, as mesmas foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade, os quais incluíam centrifugação, determinação de pH e avaliação visual diária durante 15 dias quando mantidas no ambiente e quando armazenadas à 45°C.

As medidas de pH mostraram que as formulações avaliadas apresentaram pH entre 5,86 e 6,65. De acordo com Rodrigues (1997), os valores de pH obtidos são considerados compatíveis com o pH da pele.

Com relação à análise visual, foi observado que, após 15 dias de armazenamento a 45°C, algumas formulações que continham os filtros solares associados ao *trans*-resveratrol e ao beta-caroteno sofreram alterações quanto ao aspecto visual. Apenas a F2A e a F3A não sofreram alterações quanto à cor, à homogeneidade, separação de fases e consistência, uma vez que as demais formulações acrescidas de *trans*-resveratrol e beta-caroteno (F2B, F3B, F2C, F2D e F3D) apresentaram alterações em pelo menos um dos parâmetros avaliados. Esses resultados sugerem que pode ter ocorrido alguma incompatibilidade entre as bases B, C e D, os filtros solares, o *trans*-resveratrol e o beta caroteno, uma vez que as formulações contendo apenas filtros solares, elaboradas com essas mesmas bases, não apresentaram alterações visuais após 15 dias de armazenamento à 45°C.

De forma geral, os resultados dos testes preliminares de estabilidade mostraram que as formulações contendo a base autoemulsificante A foram as que apresentaram a melhor estabilidade e, por isso, essa base foi selecionada para elaboração das formulações submetidas aos estudos de fotoestabilidade e penetração cutânea.

Atualmente, a legislação sanitária brasileira e também a norte-americana e a europeia exige das empresas, que queiram registrar e comercializar fotoprotetores, apenas testes de comprovação do FPS, FP-UVA, de determinação da resistência à água e de amplitude da proteção UV para comprovação da eficácia desses produtos (BRASIL, 2012b). Além de obedecer legislação específica para protetores solares, para o registro de um novo produto, deve-se ainda apresentar dados de estabilidade e segurança (BRASIL, 2005). No entanto, a comunidade científica tem mostrado que os fotoprotetores devem ser também submetidos ao estudo da fotoestabilidade das moléculas ativas e da formulação final para que sua qualidade seja assegurada.

O que torna a fotoestabilidade uma característica tão importante para os filtros solares e antioxidantes utilizados em fotoprotetores é fato de que o uso de moléculas fotoinstáveis pode comprometer a segurança, por meio da formação de intermediários reativos e de produtos de degradação, e a eficácia das formulações, devido à redução da quantidade de moléculas ativas e à modificação de sua estrutura química. Em contrapartida, o uso de moléculas fotoestáveis garante proteção adequada contra os raios UV sem comprometer a segurança e a eficácia das formulações, uma vez que moléculas fotoestáveis mantêm sua estrutura química e atividades biológicas inalteradas durante o período de uso (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; MARROT et al., 2004).

Estudos têm mostrado que alguns fotoprotetores perdem parte da sua proteção quando expostos à radiação UV (HAYWOOD et al., 2003; MAIER et al., 2001; MARROT et al., 2004; MAIER et al., 2005; SERPONE et al., 2002; TARRAS-WAHLBERG et al., 1999). Além disso, outros estudos na literatura mostraram que alguns filtros solares e antioxidantes apresentam fotolabilidade e também fotorreatividade frente ao UV, o que pode levar à redução da atividade fotoprotetora e antioxidante, respectivamente, dessas moléculas (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; PATTANAARGSON; LIMPHONG, 2001; PATTANAARGSON et al., 2004; SHAATH, 2010).

Nos estudos de fotoestabilidade de filtros solares e antioxidantes, bem como das formulações fotoprotetoras, os métodos analíticos que têm sido mais empregados consistem em CLAE e espectrofotometria no UV (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; GASPAR;

MAIA CAMPOS, 2006, 2010; GONZÁLEZ et al., 2007; MAIER et al., 2001), sendo fundamental utilizar os dois métodos para obter uma análise mais detalhada e completa.

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados com a escolha do solvente a ser utilizado na extração dos filtros solares e antioxidantes. Inicialmente, foi utilizado isopropanol, pois estudos anteriores do grupo, que avaliaram a fotoestabilidade de fotoprotetores, utilizaram esse solvente (GASPAR; MAIA CAMPOS 2006, 2007, 2010). Além disso, Potard et al. (1999) observaram que o isopropanol proporciona uma extração mais seletiva de filtros solares, uma vez que há redução da extração das substâncias presentes na pele, as quais poderiam gerar picos interferentes nas análises cromatográficas.

O *trans*-resveratrol e os 4 filtros solares foram solúveis em isopropanol em concentrações iguais ou maiores do que 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No entanto, o beta-caroteno e o bemotrizinol apresentaram baixa solubilidade nesse solvente, sendo que não foi possível solubilizá-los em concentrações acima de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Para solubilizar o beta-caroteno normalmente são utilizadas misturas de dois ou mais solventes orgânicos, sendo um deles de baixa polaridade (BARBA et al., 2006; LUTEROTTI; FRANKO; BICANIC, 1999; NYAMBAKA; RYLEY, 1995). Assim, foram realizados testes de solubilidade desse carotenoide a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (concentração máxima utilizada na curva analítica) em soluções compostas pelas seguintes proporções de isopropanol e tetrahidrofurano: 95:5, 90:10, 85:15; 80:20, 75:25 e 70:30. A solução que proporcionou solubilização total de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de beta-caroteno foi a composta por 70% de isopropanol e 30% de tetrahidrofurano. Além disso, essa solução possibilitou a solubilização do bemotrizinol em concentrações acima de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Depois de selecionar a solução extratora mais adequada para os ensaios de fotoestabilidade, iniciou-se a padronização das condições cromatográficas para análise dos filtros solares, do *trans*-resveratrol e do beta-caroteno nas diferentes associações utilizadas nas formulações em estudo.

As condições cromatográficas iniciais, incluindo coluna e fase móvel, foram selecionadas com base em estudos anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007, 2010) e em outros da literatura (CARERI et al., 2003; CASAGRANDE et al., 2007; DRISKELL; BASHOR; NEESE, 1983). Foram empregados diferentes gradientes e fases móveis, compostas por proporções distintas de água com 2% de ácido acético, isopropanol e metanol.

Os diversos gradientes e fases móveis foram avaliados utilizando um fluxo de 0,8  $\text{mL.min}^{-1}$ , assim, a seguir, serão descritos apenas alguns deles. Inicialmente foi utilizado

um gradiente isocrático com 26% do solvente A (água com 2% de ácido acético) e 74% do solvente B (metanol:isopropanol, 55:45) durante 53 minutos, seguido por um gradiente linear de 4 minutos, para atingir 100% do solvente B, o qual foi mantido isocrático durante 44 minutos. Outras condições utilizando uma mistura de metanol e isopropanol 55:45, e também misturas com outras proporções desses solventes, foram utilizadas. Foi observado que um aumento na quantidade de isopropanol na mistura metanol:isopropanol de 55:45 para 30:70 proporcionou redução do tempo de eluição de algumas substâncias analisadas. Dessa forma foram utilizadas eluições por gradiente que iniciavam por eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (10,5:24,5:65) por 9 minutos, ou de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (6:14:80) por 3 ou 5 minutos, seguida por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (22,2:51,8:26) por 41,5, 44,5 ou 46,5 minutos, ou de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (21:49:30) por 18,5 minutos. Por fim, foi desenvolvido outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (30:70:0) por 23 ou 50 minutos.

A partir dos resultados obtidos foi verificado que a fase móvel e o gradiente que proporcionaram a melhor separação dos 5 filtros solares e dos 2 antioxidantes em estudo consistiu em eluição inicial constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (6:14:80) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (21:49:30) por 18,5 minutos, seguida por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol:isopropanol:água com 2% de ácido acético (30:70:0) por 23 minutos.

O comprimento de onda empregado para a detecção dos filtros solares e do *trans*-resveratrol foi de 325 nm, uma vez que, após a varredura realizada a partir de soluções contendo essas substâncias, foi observado que todos apresentavam boa absorção nesse comprimento de onda, o qual é recomendado para análise de filtros solares (IKEDA et al., 1999; MEIJER; LODÉN, 1995). Para a detecção do beta-caroteno, o comprimento de onda utilizado foi de 454 nm, pois após varredura da solução de beta-caroteno, foi observado o maior pico de absorção nesse comprimento de onda. Além disso, o comprimento de onda descrito para o beta-caroteno, em análises cromatográficas, encontra-se na faixa de 450 a 476 nm (BARBA et al., 2006; LUTEROTTI; FRANKO; BICANIC, 1999; NYAMBAKA; RYLEY, 1995).

Depois de determinar as condições cromatográficas, foram realizados ensaios para avaliar a seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra- e inter-ensaios do método desenvolvido. Os resultados obtidos mostraram que o método se enquadra nos critérios exigidos pela ANVISA (BRASIL, 2003) quanto à seletividade (foi seletivo para as substâncias analisadas, e não houve interferência dos solventes utilizados e nem do veículo das formulações), linearidade ( $r > 0,99$ ), precisão ( $CV < 5\%$ ) e exatidão intra- e inter-ensaios (exatidão/recuperação entre 80 e 120%).

O estudo de fotoestabilidade por CLAE conduzido no presente trabalho mostrou que o bemotrizinol, a octiltriazone e o octocrileno não sofreram degradação após exposição aos raios UVA nas associações de filtros solares estudadas. Tais filtros solares apresentaram porcentagem remanescente média em torno de 100%, o que caracteriza fotoestabilidade. Esses resultados confirmam dados da literatura que relataram anteriormente a fotoestabilidade do bemotrizinol, da octiltriazone e do octocrileno (CHATELAIN; GABARD, 2001; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006; LHIAUBET et al., 2010).

As análises por CLAE também mostraram que o *trans*-resveratrol, o beta-caroteno, o metoxicinamato de etil-hexila e a avobenzona sofreram fotodegradação após exposição à radiação UVA em todas as associações de filtros solares avaliadas, o que resultou em redução da porcentagem remanescente média dessas substâncias de aproximadamente 16%. Esses achados estão de acordo com alguns estudos da literatura, como o de Dondi, Albini e Serpone (2006) que observaram fotolabilidade do metoxicinamato de etil-hexila e da avobenzona, e o de Bonda, Zhang e Pavlovic (2011) que observaram fotolabilidade do *trans*-resveratrol.

A redução da porcentagem remanescente da avobenzona e do metoxicinamato de etil-hexila pode ter acontecido devido à fotorreações entre essas moléculas, conforme descrito anteriormente por Dondi, Albini e Serpone (2006). Além disso, pode ter ocorrido fotoisomerização do metoxicinamato de etil-hexila à sua forma *cis*-, que pode ser considerada um produto de fotodegradação (PATTANAARGSON; LIMPHONG, 2001; PATTANAARGSON et al., 2004) ou apenas uma forma eficiente de dispersar a energia UV absorvida pela forma *trans*- (CHATELAIN; GABARD 2001). A redução da porcentagem remanescente do *trans*-resveratrol também pode ter ocorrido em consequência da fotoisomerização dessa molécula à forma *cis*- (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011), a qual apresenta baixo coeficiente de extinção molar no comprimento de onda utilizado nas análises cromatográficas (325 nm) (DOMÍNGUEZ; GUILLÉN; BARROSO, 2001).

Estudos anteriores de fotoestabilidade observaram degradação do metoxicinamato de etil-hexila e da avobenzona superior ou semelhante à encontrada no presente estudo (CHATELAIN; GABARD, 2001; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007). Chatelain e Gabard (2001) avaliaram a fotoestabilidade da avobenzona e do metoxicinamato de etil-hexila em diferentes combinações com o bemotrizinol, e observaram fotodegradação do primeiro entre 15 e 35%, e do segundo entre 30 e 45%, aproximadamente. No estudo de Gaspar e Maia Campos (2007) houve degradação de aproximadamente 40 e 20% do metoxicinamato de etil-hexila, em diferentes formulações, e de 70% da avobenzona. Assim, apesar de não ter sido obtida proteção total do metoxicinamato de etil-hexila e da avobenzona contra a degradação induzida pela radiação UVA, as três associações avaliadas proporcionaram boa fotoestabilidade para esses filtros solares.

Apesar de o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno terem sido considerados fotoinstáveis nas análises por CLAE, os resultados dessa pesquisa são promissores, uma vez que essas moléculas apresentaram fotoestabilidade muito superior ou próxima a de antioxidantes já avaliados por nosso grupo de pesquisa, tais como derivados das vitaminas A, C, e E (palmitato de retinila, tetraisopalmitato de ascorbila e acetato de tocoferila), os quais apresentaram degradação em torno de 80%, 5% e 10%, respectivamente, após exposição ao UV (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2007).

No estudo conduzido por Bonda, Zhang e Pavlovic (2011), no qual foi avaliada a fotoestabilidade do *trans*-resveratrol em um formulação contendo ou não o fotoestabilizador etil-hexil metoxicrileno, foi observado que, após irradiação por UV, houve recuperação de 90,58% e de 45,21% do *trans*-resveratrol na formulação que continha o fotoestabilizador e na que não o continha, respectivamente. Vítek et al. (2009) observaram que o beta-caroteno pode sofrer degradação na presença da radiação UV, sendo que, após 60 e 180 minutos de irradiação (250-400 nm), ocorreu degradação de aproximadamente 25 e 55% desse carotenoide, respectivamente. Assim, podemos afirmar que nas 3 associações de filtros solares avaliadas no presente estudo, o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno apresentaram boa recuperação, uma vez que foram obtidos valores de porcentagem remanescente entre 80,05 e 87,87% nessas formulações.

O bemotrizinol é conhecido por sua eficiência em estabilizar a avobenzona na presença da radiação UV (CHATELAIN e GABARD, 2001). Ao comparar as formulações estudadas, contendo diferentes associações de filtros solares, foi observado que o bemotrizinol melhorou a fotoestabilidade do beta-caroteno e da avobenzona, quando estava presente na F2RB e foi comparado com a formulação que apresentava a associação 1 (F1RB).

A octiltriazone apresentou elevada fotoestabilidade nesse estudo. Entretanto, ao comparar a porcentagem remanescente da avobenzona na formulação F1F (contendo octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila e avobenzona) e F3F (contendo octocrileno, metoxicinamato de etil-hexila, avobenzona e octiltriazone), foi observada redução da fotoestabilidade desta molécula. Isso pode ter acontecido em consequência de fotorreações entre a avobenzona, o metoxicinamato de etil-hexila e a octiltriazone, induzidas pela radiação UVA.

Os resultados do estudo de fotoestabilidade por CLAE indicaram que, em fotoprotetores, o uso do *trans*-resveratrol e do beta-caroteno em combinação é mais vantajoso do que separadamente, uma vez que algumas formulações contendo os antioxidantes separadamente (F2R, F2B, F1R, F2R, F2B, F3R e F3B) apresentaram menor fotoestabilidade do que as formulações que continham os antioxidantes associados (F1RB, F2RB e F3RB), particularmente quando a fotoestabilidade foi avaliada em termos de porcentagem remanescente de *trans*-resveratrol, metoxicinamato de etil-hexila e avobenzona.

A combinação desses antioxidantes também promoveu melhora da fotoestabilidade da avobenzona na formulação F3RB com relação à F3F, o que indica que a associação dos filtros solares com os antioxidantes estudados pode ter resultado em um efeito fotoestabilizador na associação 3 (octocrileno/metoxicinamato de etil-hexila/avobenzona/octiltriazone).

A absorção de fótons UV pela avobenzona pode levar à formação de  $^1\text{O}_2$ , o qual pode interagir com a própria avobenzona e também com outros filtros solares formando vários produtos de degradação (KOCKLER et al., 2012; LHIAUBET-VALLET et al., 2010). Adicionalmente, estudos mostram que a associação do beta-caroteno a outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E pode promover um efeito antioxidante sinérgico (BÖHM et al., 1998). Assim, pode ser sugerido que a presença do beta-caroteno e do *trans*-resveratrol em uma mesma formulação pode ter resultado em um efeito antioxidante sinérgico, o qual resultou na melhora da fotoestabilidade da avobenzona nas formulações F1RB, F2RB e F3RB, por meio da redução da quantidade de  $^1\text{O}_2$  livre para interagir com as moléculas fotoexcitadas.

Considerando os resultados obtidos à cerca do uso do *trans*-resveratrol e do beta-caroteno em fotoprotetores, sugere-se que o uso dessas moléculas separadamente pode prejudicar a fotoestabilidade das formulações. Entretanto, sugere-se também que a associação desses antioxidantes poderia proporcionar proteção mais eficaz contra os danos induzidos pela radiação UVA na pele por melhorar a fotoestabilidade da formulação.

As análises espectrofotométricas mostraram que a associação 2 apresentou maior absorção na faixa da UVA devido à presença do bemotrizinol, o qual possui alta absorção na faixa da UVA (CHATELAIN; GABARD, 2001). Já a associação 3, apresentou maior absorção na faixa da UVB devido à presença da octiltriazone, que possui alta absorção UVB (TUCHINDA et al., 2006).

As análises espectrofotométricas também mostraram que todas as formulações em estudo foram consideradas fotoestáveis, pois houve redução significativa, tanto da proteção UVA e UVB, quanto da razão UVA/UVB de todas as formulações, provavelmente devido à fotodegradação da avobenzona, observada nas análises por CLAE, que apresenta alta absorção no UVA longo (340-400 nm). Apesar disso, a razão UVA/UVB das formulações se manteve elevada após irradiação ( $>0,83$ ), o que também ocorreu provavelmente devido à presença da avobenzona, que, como mencionado anteriormente, proporciona elevada absorção na faixa da UVA.

De acordo *Boots Star Rating System* (BOOTS THE CHEMISTS, 2004), a maioria das formulações apresentou ultra proteção UVA (5 estrelas, Razão  $\geq 0,9$ ), mesmo após irradiação, sendo que algumas formulações estudadas apresentaram máxima proteção UVA (4 estrelas,  $0,8 < \text{Razão} < 0,9$ ). Apesar disso, a queda da razão UVA/UVB pode ter comprometido não só a eficácia, mas também a segurança das formulações, devido à fotolabilidade do *trans-resveratrol*, do metoxicinamato de etil-hexila, da avobenzona e do beta-caroteno, demonstrada nas análises por CLAE.

Ao comparar os valores de razão UVA/UVB das formulações contendo a associação 1 de filtros solares com seus correspondentes que apresentavam bemotrizinol (associação 2) e octiltriazone (associação 3) foi observado que as últimas apresentaram, respectivamente, aumento e redução significativos da razão UVA/UVB devido à presença do bemotrizinol, que apresenta elevada absorção na faixa da UVA e promoveu aumento razão (CHATELAIN; GABARD, 2001), e devido à presença da octiltriazone, que por absorver intensamente UVB (TUCHINDA et al., 2006), promoveu redução da razão.

Considerando os valores de queda na razão UVA/UVB das formulações contendo as três associações de filtros solares, podemos afirmar que, de forma geral, o bemotrizinol melhorou a fotoestabilidade das formulações, provavelmente devido ao seu efeito fotoestabilizador sobre a combinação avobenzona/metoxicinamato de etil-hexila (CHATELAIN; GABARD, 2001), enquanto que a octiltriazone reduziu a fotoestabilidade das



mesmas, que pode ter ocorrido devido ao aumento da fotodegradação da avobenzona na presença da octiltriazona.

Considerando os resultados do estudo de fotoestabilidade por CLAE e por espectrofotometria discutidos acima, é possível afirmar que as formulações contendo a associação 2 de filtros solares foram as mais fotoestáveis dentre todas as estudadas. Assim, as formulações F2F, F2R, F2B e F2RB foram selecionadas para o estudo de penetração cutânea.

O estudo de penetração cutânea de filtros solares e de antioxidantes em formulações fotoprotetoras também têm grande relevância no que diz respeito à eficácia e segurança dessas formulações. Antes de iniciar esse estudo, foi necessário reavaliar a seletividade e a linearidade, estabelecer o limite inferior de quantificação do método de CLAE, anteriormente padronizado para o estudo de fotoestabilidade, e também avaliar a recuperação dos filtros solares e antioxidantes.

Os resultados obtidos mostraram que o método foi seletivo, uma vez que não houve interferência da solução receptora, da fita adesiva e dos constituintes da pele nas análises por CLAE. Entretanto, a fita adesiva utilizada pode ter influenciado na baixa taxa de recuperação do beta-caroteno (< 60%), o que pode ter ocorrido devido à elevada lipossolubilidade dessa substância. Apesar disso, as demais substâncias estudadas apresentaram taxa de recuperação superiores a 84%. O método também apresentou linearidade no intervalo de concentração avaliado, pois todas as substâncias apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 (BRASIL, 2003). Após a padronização do método de CLAE para o estudo de penetração cutânea, os experimentos foram iniciados.

Nos estudos *in vitro*, a avaliação da penetração é feita normalmente com pele de porco, particularmente da orelha, devido à facilidade de aquisição, menor variabilidade, e também devido à semelhança morfofuncional entre a epiderme suína e epiderme humana (BARBERO, FRASCH, 2009).

No presente trabalho, o estudo de penetração cutânea foi conduzido em pele de orelha de porco por um período de 12 horas. Esse tempo foi determinado com base em estudos anteriores de penetração cutânea *in vitro* (CASAGRANDE et al, 2007; VICENTINI et al., 2009) e também visando mimetizar as condições reais de uso, já que normalmente a permanência de produtos cosméticos na pele por um período superior a 12 horas não é comum.

Os resultados das análises das soluções receptoras das células que receberam as formulações F2F, F2R, F2B e F2RB mostraram que, os filtros solares e antioxidantes avaliados provavelmente não permearam através da pele, uma vez que não foi possível

detectá-los na solução receptora utilizando como parâmetro o LIQ do método analítico. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Hayden et al. (2005), que não detectaram avobenzona na solução receptora, e também com o de Potard et al. (1999), que encontraram quantidades extremamente baixas do metoxicinamato de etil-hexila ( $0.03 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e não detectaram octocrileno na solução receptora. Além disso, os resultados do presente estudo estão conforme o esperado para formulações cosméticas, cujas substâncias ativas não devem alcançar a circulação sistêmica (THIERS; TASSEAU, 2005).

Na avaliação da penetração cutânea, foi utilizado um excesso de formulação (250 mg). Assim, ao calcular a porcentagem das substâncias em estudo que ficaram retidas na pele, foram obtidos valores abaixo de 2%, que se encontravam em uma faixa de 0,02 a 0,07% na E+D e de 0,29 a 1,18% no EC, para os filtros solares, e em uma faixa de 0,04 a 0,22% na E+D e de 0,22 a 1,63% no EC, para os antioxidantes. Entretanto, de uma maneira geral, as concentrações das substâncias em estudo encontradas na E+D e no EC foram bastante significativa para todas as formulações avaliadas com relação a alguns estudos da literatura (DAL BELO et al., 2009; LOPES et al., 2010; POTARD et al., 1999; SIMEONI; SCALIA; BENSON, 2004; VICENTINI et al., 2009).

A análise da distribuição das substâncias em estudo, na E+D e no EC, mostrou que mais de 90% da quantidade retida dos filtros solares foi encontrada no EC, após 12 horas de aplicação das formulações F2F, F2R, F2B e F2RB. Esses resultados foram satisfatórios, uma vez que os filtros solares devem proteger a pele por meio da redução da quantidade de radiação que atinge esse órgão, sem que para isso tenham que alcançar as camadas mais profundas da pele, ou seja, devem permanecer na superfície da pele ou no estrato córneo para que sejam eficazes (MAVON et al., 2007; YANG et al., 2008). Além disso, outros estudos da literatura também observaram distribuição dos filtros solares no EC acima de 90 %, com relação ao total retido (CHATELAIN; GABARD; SURBER, 2003; WEIGMANN et al., 1999).

A retenção majoritária dos filtros solares no EC também representa uma vantagem quanto à segurança dos fotoprotetores, pois a presença de uma elevada concentração de filtros fotolábeis nas camadas mais profundas da pele pode aumentar as chances de ocorrerem reações tóxicas ou alérgicas, em virtude da geração de produtos de degradação e radicais livres nesse órgão (YANG et al., 2008).

Com relação aos antioxidantes, a análise da sua distribuição nas camadas da pele mostrou que mais de 80% da quantidade total retida foi encontrada no EC, após 12 horas de aplicação das formulações F2R, F2B e F2RB. Embora pequenas porcentagens de *trans-*

resveratrol e beta-caroteno tenham sido encontradas na E+D (< 20%) com relação ao total retido, as quantidades encontradas foram significativas em se tratando de estudos de retenção cutânea de polifenóis e carotenóides (DAL BELO et al., 2009; LOPES et al., 2010; VICENTINI et al., 2009).

A elevada porcentagem dos filtros solares e antioxidantes em estudo detectadas no EC (> 80%) pode ter sido devida à alta lipofilicidade dessas substâncias, já que o estudo de Zilius, Ramanauskien e Briedis (2013) sugere que a lipofilicidade de uma molécula está diretamente relacionada com sua habilidade de penetrar a epiderme e inversamente relacionada com sua habilidade de penetrar a derme. Ainda, segundo Lopes, Speretta e Bentley (2007) a alta lipoficilidade contribui para a retenção das substâncias no EC devido à sua afinidade com os componentes dessa camada. Adicionalmente, a pequena concentração do bemotrizinol encontrada no EC, com relação as demais filtros solares, e a retenção superior a 90% nessa camada, podem ser devidas ao alto peso molecular dessa molécula (> 500 Daltons).

Quando o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno foram utilizados em combinação (F2RB), foi observado que a quantidade desses antioxidantes retida no EC foi estatisticamente inferior ao encontrado, nessa mesma camada da pele, quando essas substâncias foram utilizadas separadamente (F2R e F2B). Esses resultados sugerem que a associação do *trans*-resveratrol com o beta-caroteno na formulação F2RB reduz a retenção dessas moléculas no EC, embora não tenha alterado retenção na E+D. Apesar disso, estudos mostram que a associação de antioxidantes em uma mesma formulação resulta em um efeito sinérgico na atividade antioxidante e na proteção da pele contra o UV (CHO et al., 2007; LIN et al., 2003; LIN et al., 2005; OFFORD et al., 2002; STEENVOORDEN, BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). Assim, os benefícios da utilização de antioxidantes em associação é justificado, mesmo que isso leve à redução da sua retenção cutânea.

Também foi observado que o beta-caroteno, quando utilizado separadamente (F2B) ou em combinação com o *trans*-resveratrol (F2RB), provocou redução significativa da retenção no EC de todos os filtros solares avaliados quando comparados com os valores obtidos após aplicação das formulações F2F e F2R, o que pode representar uma vantagem, já que os filtros solares devem permanecer na superfície da pele ou no estrato córneo para que sejam eficazes (MAVON et al., 2007; YANG et al., 2008). Esses resultados sugerem que a retenção dos filtros solares no EC pode ser alterada na presença de beta-caroteno. Entretanto, não há indícios na literatura sobre os possíveis mecanismos pelos quais o beta-caroteno poderia interferir na retenção cutânea do octocrileno, do metoxicinamato de etil-hexila, da avobenzona e do bemotrizinol.

Além de a presença do beta-caroteno nas formulações ter reduzido a retenção dos filtros solares no EC, o uso de antioxidantes em fotoprotetores apresenta outros benefícios sobre a eficácia e a segurança das formulações. Os próprios filtros orgânicos podem gerar radicais livres após excitação pelo UV (XU et al., 2001), os quais podem ser neutralizados pelos antioxidantes da formulação. Além disso, a adição de antioxidantes aos fotoprotetores pode resultar, ainda, em maior proteção da pele contra os danos induzidos pelos raios UV (WU et al., 2011).

Finalizando, o uso de formulações multifuncionais contendo filtros solares e antioxidantes tem sido uma tendência na área cosmética, entretanto há poucos estudos indicando os reais benefícios dessa associação. Assim, o presente estudo apresenta uma grande contribuição quanto a dois aspectos importantes em se tratando de fotoprotetores: a fotoestabilidade e a penetração cutânea. As associações de filtros solares avaliadas, apesar de não terem oferecido proteção total contra a degradação da avobenzona, do metoxicinamato de etil-hexila, do *trans*-resveratrol e do beta caroteno, proporcionaram uma boa fotoestabilidade para essas substâncias. A combinação do beta-caroteno e do *trans*-resveratrol, os quais estão entre os antioxidantes utilizados em formulações cosméticas, resultou em melhor fotoestabilidade das formulações. Além disso, a combinação desses antioxidantes também apresentou vantagens no estudo de retenção cutânea, uma vez que reduziu a penetração dos filtros solares.

## ***7. Conclusão***

- Todas as formulações se mantiveram estáveis após o teste de centrifugação e apresentaram pH dentro da faixa esperada.
- As formulações elaboradas com a base autoemulsificante A foram as mais estáveis nos testes preliminares de estabilidade, sendo que as formulações à base das ceras B, C e D apresentaram alterações quanto ao aspecto visual.
- O método de CLAE foi desenvolvido e padronizado de acordo com os parâmetros propostos para identificação e quantificação simultânea dos filtros solares e dos antioxidantes nos estudos de fotoestabilidade e penetração cutânea.
- No estudo de fotoestabilidade por CLAE, o octocrileno, a octiltriazona e o bemotrizinol foram considerados fotoestáveis. Entretanto o *trans*-resveratrol, o metoxicinamato de etil-hexila, a avobenzona e o beta-caroteno, apesar de apresentarem boa fotoestabilidade, não foram considerados fotoestáveis.
- Nas análises espectrofotométricas, todas as formulações em estudo foram consideradas fotoestáveis, uma vez que foi observada uma queda estatisticamente significativa da razão UVA/UVB quando as formulações não irradiadas e irradiadas foram comparadas entre si. Além disso, as formulações contendo a associação 2 de filtros solares foram as mais fotoestáveis dentre as estudadas.
- Os resultados dos testes de fotoestabilidade indicaram que a associação dos filtros solares ao *trans*-resveratrol e ao beta-caroteno em combinação foi considerada vantajosa, uma vez que resultou na melhora da fotoestabilidade de algumas formulações.
- O estudo de penetração cutânea mostrou que, após aplicação das formulações contendo a associação 2 de filtros solares, os filtros solares e antioxidantes avaliados penetraram a pele, mas não permearam até a solução receptora, ou seja, ficaram retidos no EC, majoritariamente, e na E+D.
- O estudo de penetração cutânea também mostrou que a presença do beta-caroteno nas formulações pode reduzir a retenção dos filtros solares no EC, o que pode ser considerado como mais uma vantagem em associar antioxidantes e filtros solares em fotoprotetores.
- A associação dos filtros solares estudados com o *trans*-resveratrol e o beta-caroteno, em combinação, proporcionou benefícios sobre a fotoestabilidade das formulações e retenção cutânea dos filtros solares, uma vez que resultou em melhor fotoestabilidade das formulações e reduziu a penetração dos filtros solares.

## *Referências*

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by *trans*-resveratrol in SKH-1 hairless mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 186, n. 1, p. 28–37, 2003.

AZIZ, M. H.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n.1, p. 25-31, 2005.

BAI, S. K.; LEE, S. J.; NA, H. J.; HÁ, K. S.; HAN, J. A.; LEE, H.; KWON, Y. G.; CHUNG, C. K. ET AL. Beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 37, n. 4, p. 323-334, 2005.

BANDO, N.; HAYASHI, H.; WAKAMATSU, S.; INAKUMA, T.; MIYOSHI, M.; NAGAO, A.; YAMAUCHI, R.; TERAQ, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary beta-carotene: an *ex vivo* study. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, n. 11, p. 1854-1863, 2004.

BARBA, A. I. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. C. S.; RUIZ, V. F.; TEJADA, M. L. S. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. **Food Chemistry**, v. 95, p. 328-336, 2006.

BARBERO, A. M.; FRASCH, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1-13, 2009.

BAR-NATAN, R.; LOMNITSKI, L.; SOFER, Y.; SEGMAN, S.; NEEMAN, I.; GROSSMAN, S. Interaction between  $\beta$ -carotene and lipoxygenase in human skin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 935–941, 1996.

BARRET, C. W. Skin penetration. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, v. 20, 487-499, 1969.

BASF. **BASF Sunscreen Simulator**. Disponível em: <[www.basf.com/sunscreen-simulator](http://www.basf.com/sunscreen-simulator)>. Acesso em: 30 jul. 2011.

BAXTER, R. A. Anti-aging properties of resveratrol: a review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 1, p. 2-7, 2007.



BAYERL, Ch. Beta-carotene in dermatology: does it help? **Acta Dermatovenerol Alpina, Panonica, et Adriatica**, v. 17, n. 4, p. 1-6, 2008.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 4, p. 61-64, 1999.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 539-549, 2008.

BERSET, G.; GONZENBACH, H.; CHRIST, R.; MARTIN, R.; DEFLANDRE, A.; MASCOTTO, R. E.; JOLLEY, J. D.; LOWELL, W.; PELZER, R.; STIEHM, T. Proposed protocol for determination of photostability Part I: cosmetic UV filters. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 18, n. 4, p. 167-177, 1996.

BIESALSKI, H. K.; OBERMUELLER-JEVIC, U. C. UV light, beta-carotene and human skin – beneficial and potentially harmful effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 389, n. 1, p. 1-6, 2001.

BLACK, H. S.; LENGER, W.; THORNBY, J. I. Relation of UV dose to antioxidant modification of photocarcinogenesis. **International Journal of Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 201-207, 1983.

BÖHM, F.; EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T.G. Beta-Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO<sub>x</sub>. **FEBS Letters**, v. 436, p. 387-389, 1998.

BONDA, C. **Sunscreens vs. Photostabilizer** (2007). 2013. Disponível em: <<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/category/suncare/10377137.html>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

BONDA, C.; ZHANG, J.; PAVLOVIC, A. The photostability and photostabilization of *trans*-resveratrol. **Cosmetic & Toiletries**, v. 126, n. 9, p. 652-660, 2011.

Boots the Chemist Ltd. (England), **The Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA: UVB Ratios According to The Boots Star Rating System**. Nottingham: The Boots CO PLC; 2004.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1-36, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” anexo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, DF: ANVISA, 2004. (Séries Qualidade em cosméticos, v. 1). 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidas a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2012. 2012a. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia\\_cosmeticos\\_grafica\\_final.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 10 jul. 2013.

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

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J.-F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of Controlled Release**, v. 60, p. 67–76, 1999.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

BUCHALSKA, M.; KRAS, G.; OSZAJCA, M.; LASOCHA W.; MACYK, W. Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 213, p. 158–163, 2010.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.  $\beta$ -carotene: an usual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, p. 569-573, 1984.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analyses of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5226-5231, 2003.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; JUNIOR, W.A.V.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. *In vitro* evaluation of quercetincutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzene) and ethylhexylmethoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyltriazine (tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, 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 Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 16, p. 28-35, 2003.

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

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radicals chemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 481-93, 1993.

CHO, H. S.; LEE, M. H.; LEE, J. W.; NO, K. O.; PARK, S. K.; LEE, H. S.; KANG, S.; CHO, W. G. et al. Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 23, n. 5, p. 155-162, 2007.

CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P.; TAGAMI, H. et al. What is the 'true' function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 159-187, 2002.

CONN, P. F.; LAMBERT, C.; LAND, E. J.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Carotene-oxygen radical interactions. **Free Radical Research**, v. 16, n. 6, p. 401-408, 1992.

CROVARA PESCIA, A.; ASTOLFI, P.; PUGLIA, C.; BONINA, F.; PERROTTA, R.; HERZOG, B.; DAMIANI, E. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is best? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 217–223, 2012.

DAL BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; MARTY, J.P. Skin penetration of epigallocatechin-3-gallate and quercetin from green tea and *Ginkgo biloba* extracts vehiculated in cosmetic formulations. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p. 299-304, 2009.

DALY, C. H. Biochemical properties of dermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 79, n. 1, p. 17-20, 1982.

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. **Journal of Photochemistry Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 204-213, 2006.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **J. Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 95–104, 2007.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; GIESINGER, J.; EHLIS, T.; HERZOG, B.; GRECI, L.; BASCHONG, W. Assessment of the photo-degradation of UV-filters and radical- induced peroxidation in cosmetic sunscreen formulations. **Free Radical Research**, v. 44, n. 3, p. 304-312, 2010.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free Radicals in Cutaneous Biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 671–675, 1994.

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

DE GRUIJL, F. R. Action spectrum for photocarcinogenesis. **Recent Results in Cancer Research**, v. 139, p. 21-30, 1995.

DEGWERT, J.; PAPE, W.; HOPPE, U. *In vitro* analysis of immunoprotective effects of topical sunscreens. **Toxicology In Vitro**, v. 8, n. 4, p. 747-749, 1994.

DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 16, n. 2, p. 47-52, 1994.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 6, p. 1024-1035, 2000.

DOMÍNGUEZ, C.; GUILLÉN, D.A.; BARROSO, C.G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 303-310, 2001.

DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 9, p. 835-843, 2006.

DRISKELL, W. J.; BASHOR, M. M.; NEESE, J. W. Beta-carotene determined in serum by liquid chromatography with an internal standard. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 1042-1044, 1983.

DZEBA, I.; PEDZINSKI, T.; MIHALJEVIC, B. Reaction kinetics of resveratrol with tert-butoxyl radicals. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 1294-1296, 2012.

EDGE, R.; MCGARVEY, D.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as antioxidants. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 41, p. 189-200, 1997.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in Dermatology**, v. 13, p. 375-380, 1995.

EPSTEIN, H. A. The next frontier of sunscreen protection: beyond sunscreens. **Skinmed**, v. 9, n. 4, p. 247-250, 2011.

EVELSON, P.; ORDÓÑEZ, C. P.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n. 2-3, p. 215-219, 1997.

FELTON, L. A.; WILEY, C. J.; GODWIN, D. A. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 9, p. 1117-1124, 2002.

FERRER, P.; ASENSI, M.; SEGARRA, R.; ORTEGA, A.; BENLLOCH, M.; OBRADOR, E.; VAREA, M. T.; ASENSIO, G. et al. Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. **Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2005.

Food and Drug Administration (FDA). **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 10 abr 2013.

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

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.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1490-1494, 2010.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 2007.

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

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 16, p. 109-26, 1997.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 101, n. 8, p. 659-672, 2010.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

GONZÁLEZ, H.; TARRAS-WAHLBERG, N.; STRÖMDAHL, B.; JUZENIENE, A.; MOAN, J.; LARKÖ, O.; ROSÉN, A.; WENNBERG, A. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. **BMC Dermatology**, v.7, n.1, 2007.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 614-626, 2008.

GRANGER, K. L.; BROWN, P. R. The chemistry and HPLC analysis of chemical sunscreen filters in sunscreen and cosmetics. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 24, n. 19, p. 2895-2924, 2001.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of *trans*-resveratrol: A structure-activity insight. **Innov. Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, p. 210-218, 2010.

GUPTA, V.K.; ZATZ, J.L.; REREK, M. percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, p. 1602-1607, 1999.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. Anti-angiogenic effect of *Biophytum sensitivum* is exerted through its cytokine modulation activity and inhibitory activity against VEGF mRNA expression, endothelial cell migration and capillary tube formation. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 6, n. 3, p. 241-250, 2007.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

**Hanson Research**. Disponível em: <<http://www.hansonresearch.com>>. Acesso: em 27 de junho de 2013.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 8, p. 1205-1212, 2006.

HATA, T. R.; SCHOLZ, T. A.; ERMAKOV, I. V.; MCCLANE, R. W.; KHACHIK, F.; GELLERMANN, W.; PERSHING L. K. Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 441-448, 2000.

HAYDEN, C. G. J.; CROSS, S. E.; ANDERSON, C.; SAUNDERS, N.A.; ROBERTS, M. S. Skin sunscreen penetration of human skin and related keratinocyte toxicity after topical application. **Pharmacology and Physiology**, v. 18, p. 170-174, 2005.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma? **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, p. 862-868, 2003.

HERRLING, Th.; JUNG, K.; FUCHS, J. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 63, p. 840-845, 2006.

IKEDA, K.; SUZUKI, S.; WATANABE, Y. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 482, n. 1, p. 240-245, 1989.

**INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA)**. 1996-2012. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_ao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma)>. Acesso em: jun. 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. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 57-61, 2004.

JIANG, R.; HAYDEN, R. C. G. J.; PRANKERD, J.; ROBERTS, M. S.; BENSON, H. A. E. High-performance liquid chromatographic assay for common sunscreens in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 682, p. 137-145, 1996.

JOU, P. C.; FELDMAN, R. J.; TOMECKI, K. J. UV protection and sunscreens: What to tell patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 79, n. 6, p. 427-436, 2012.

KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 4, p. 811-816, 1997.

KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B.D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 13, p. 91-110, 2012.

KONAKA, R.; KASAHARA, E.; DUNLAP, W. C.; YAMAMOTO, Y.; CHIEN, K. C.; INOUE, M. Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen. **Redox Report: communications in free radical research**, v. 6, n. 5, p. 319-325, 2001.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.



KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 937-958, 2005.

LAFFORGUE, C.; MARTY, J. P. Percutaneous absorption. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 134, n. 3, p. 18-23, 2007.

LATHEESHJLAL, L.; PHANITEJASWINI, P.; SOUJANYA, Y.; SWAPNA, U.; SARIKA, V.; MOULIKA, G. Transdermal Drug Delivery Systems: An Overview. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 4, p. 2140-2148, 2011.

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. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 348-352, 1995a.

LAVKER, R. M.; GERBERICK, G. F.; VERES, D.; IRWIN, C. J.; KAIDBEY, K. H. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UVB and UVA in human skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 53-62, 1995b.

LEVY, S. B. **Sunscreens**. 2. ed. Wolverson SE, editor. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 703-718.

LEWICKA, Z. A.; YU, W. W.; OLIVA, B. L.; CONTRERAS, E. Q.; COLVIN, V. L. Photochemical behavior of nanoscale TiO<sub>2</sub> and ZnO sunscreen ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 263, n. 1, p. 24-33, 2013.

LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M. A. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 552-558, 2010.

LIM, H. W.; DRAELOS, Z. D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection**. Inform Health Care USA, Inc. New York. 332 p., 2009.

LIN, J. Y.; SELIM, M. A.; SHEA C. R.; GRICHNIK, J. M.; OMAR, M. M.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; PINNELL, S. R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 866-874, 2003.

LIN, F. H.; LIN, J. Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, M. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GRICHNIK, J. M.; ZIELINSKI J.; PINNELL, S. R. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins A and E and doubles its photoprotection of skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 4, p. 826-832, 2005.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F.; BENTLEY, M. V. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 209-215, 2007.

LOPES, L.B.; VANDEWALL, H.; LI, H.T.; VENUGOPAL, V.; LI, H.K.; NAYDIN, S.; HOSMER, J.; LEVENDUSKY, M. et al. Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, 2010.

LOWE, N. J.; MEYERS, D. P.; WIEDER, J. M.; LUFTMAN, D.; BORGET, T.; LEHMAN, M. D.; JOHNSON, A. W.; SCOTT, I. R. Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, n. 6, p. 739-743, 1995.

LUTEROTTI, S.; FRANKO, M.; BICANIC, D. Ultrasensitive determination of beta-carotene in fish oil-based supplementary drugs by HPLC-TLS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 901-909, 1999.

MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar simulated radiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 256-262, 2001.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; MARTINCIGH, B. S.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p. 84-92, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARROT, L.; BELAIDI, 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. **The British Journal of Dermatology**, v. 151, p. 1234-1244, 2004.

MATSUI, M. S.; DELEO, V. A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. **Cancer Cells**, v. 3, n. 1, p. 8-12, 1991.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 765-783, 2002.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298–308, 2004.

MAVON, A.; MIQUEL, C.; LEJEUNE, O.; PAYRE, B.; MORETTO, P. *In vitro* percutaneous absorption and *in vivo* stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, p. 10-20, 2007.

MEIJER, J.; LODÉN, M. Stability analysis of three UV-filters using HPLC. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 9, p. 1821-1832, 1995.

MENON, E. L.; MORRISON H. Formation of singlet oxygen by urocanic acid by UVA irradiation and some consequences thereof. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 6, p. 565-569, 2002.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002. Supplement 1.

MIURA T.; MURAOKA S.; IKEDA, N.; WATANABE, M. FUJIMOTO, Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, p. 203-208, 2000.

MOAN, J.; DAHLBACK, A.; SETLOW, R. B. Epidemiological Support for an Hypothesis for Melanoma Induction Indicating a Role for UVA Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 2, p. 243-247, 1999.

MORTENSEN, A. Scavenging of acetylperoxyl radicals and quenching of triplet diacetyl by beta-carotene: mechanisms and kinetics. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 1-2, p. 62-67, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MOYAL, D. D.; FOURTANIER, A. M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 149-154, 2008. Supplement 2.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B. S. Photostability of the suncreening agent 4-tert-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 200, p. 410–420, 2008.

NASH, J. F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 35-51, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What you need to know about melanoma and other skin cancers**. 2010. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/skin.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 1-19, 2010.

NIELSEN, B. R.; JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Triplet-triplet extinction coefficients, rate constants of triplet decay and rate constants of anthracene triplet sensitization by laser flash photolysis of astaxanthin,  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and zeaxanthin in deaerated toluene at 298 K. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 112, p. 127-133, 1998.

NOHYNEK, G. J.; SCHAEFERY, H. Benefit and Risk of Organic Ultraviolet Filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 285–299, 2001.

NYAMBAKA, H.; RYLEY, H. An isocratic reversed-phase HPLC separation of the stereoisomers of the provitamin A carotenoids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene) in dark green vegetables. **Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 63-72, 1996.

O'CONNOR, I.; O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 16, n. 3, p. 226-230, 1998.

OFFORD, E. A.; GAUTIER, J.; AVANTI, O.; SCALETTA, C.; RUNGE, F.; KRAMER, K.; APPLGATE, L. A. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 12, p. 1293–1303, 2002.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.A. A blocked diketo form of avobenzene: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 178-184, 2009.

PARRISH, J. A.; JAENICKE, K. F.; ANDERSON, R. R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 36, p. 187-191, 1982.

PATHAK, M. A.; JIMBOW, K.; PARRISH, J.A. Effect of UV-A, UV-B, and psoralen on *in vivo* human melanin pigmentation. **Pigment Cell**, v. 3, p. 291–298, 1976.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. 4. ed. **Dermatology in general medicine**. v. 1: New York: McGraw Hill, Inc., 1993, cap. 137, p. 1689–1716.

PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octylmethoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, p. 153-160, 2001.

PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAN, P. Photoisomerization of octylmethoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 161, p. 269-274, 2004.

PEZZUTO, J. M. Resveratrol as an Inhibitor of Carcinogenesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 8, n. 7-8, p. 443-573, 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19, 2003.

POTARD, G.; LAUGEL, C.; BAILLET, A.; SCHAEFER H., MARTY, J.P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during *in vitro* percutaneous penetration studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, p. 249-260, 1999.

RASTOGI, V.; YADAV, P. Transdermal drug delivery system: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 161-170, 2012.

REAGAN-SHAW, S.; AFAQ, N.; AZIZ, M. H.; AHMAD, N. Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. **Oncogene**, v. 23, p. 5151-5160, 2004.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Revista de Cosmiatria & Medicina Estética**, v. 5, n. 2, p. 26-35, 1997.

ROELANDTS, R. Shedding light on sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 147-157, 1998.

ROSSETTI, F. C.; DEPIERI, L. V.; TEDESCO, A. C.; B. BENTLEY, M. V. L. Fluorometric quantification of protoporphyrin IX in biological skin samples from *in vitro* penetration/permeation studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 753-760, 2010.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PASQUALE, A. D.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39-47, 2000.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation in lipid microparticles of the UVA filter, butyl methoxydibenzoylmethane combined with the UVB filter, octocrylene: effect on photostability. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 384-390, 2009.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M.; FARWELL, D. W.; MOORE, J.; EDWARDS, H. G. Oxybenzone oxidation following solar irradiation of skin: photoprotection versus antioxidant inactivation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, n. 3, p. 583-586, 1996.

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.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoylmethane UVA filters Part 1. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 3, p. 229-234, 1995.

SCHWITZGEBEL, J.; EKERDT, J. G.; GERISCHER, H. ; HELLER, A. Role of the oxygen molecule and of the photogenerated electron in TiO<sub>2</sub>-photocatalyzed air oxidation reactions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p. 5633-5638, 1995.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). SCCS 1358/10. **Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients**. Adopted by the SCCS, 22 June, 2010. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_s\\_002.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_002.pdf)>. Acesso em: 05 mar 2013.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A. V.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; ZHAO, J. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, p. 970-981, 2002.

SETLOW, R. B.; GRIST, E.; THOMPSON, K.; WOODHEAD, A. D. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6666-6670, 1993.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 9, p. 464-469, 2010.

SHANKAR, S.; SINGH, G.; SRIVASTAVA, R. K. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4839-4854, 2007.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; BENSON, H. A. E. Influence of cyclodextrins on *in vitro* human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 163-171, 2004.

STEENVOORDEN, D. P. T.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 41, p. 1-10, 1997.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, p. 79-89, 2001.

STOKES, R.; DIFFEY, B. *In vitro* assessment of sunscreen photostability: the effect of radiation source, sunscreen application thickness and substrate. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 21, n. 5, p. 341-351, 1999.

TARRAS-WAHLBERG, N.; STENHAGEN, G.; LARKO, O.; ROSEN, A.; WENNBERG, A. M.; WENNERSTROM, O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, p. 547-553, 1999.

TEDESCO, A. C.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 561-575, 1997.

THAKKER, K.D.; CHERN, W.H. Development and validation of *in vitro* release tests for semisolid dosage forms – Case study. **Dissolution technologies**, p. 10-15, 2003.

THIERS, S.; TASSEAU, O. Les cosméceutiques: cosmétiques ou médicaments? **MiDiFABs**, v. 3, p. 47-56, 2005.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.

TYRREL, R. M. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-77, 1994.

UCHOA, A. F.; KNOX, P. P.; TURCHIELLE, R.; SEIFULLINA, N.; BAPTISTA, M.S. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. **European Biophysics Journal**, v. 37, p. 843-850, 2008.

VAN ETTEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J. A.; FARMER, E. E. Two Classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “phytoanticipins”. **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.



VICENTINI, F. T. M. C.; GEORGETTI, S. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Assessment of *in vitro* methodologies to determine topical and transdermal delivery of the flavonoid quercetin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, 2009.

VÍTEK, P.; JEHLIČKA, J.; BEZDĚK, J.; FRANČU, E. **Degradation of beta-carotene under UV-rich irradiation conditions: implications for martian environment**. In: 40<sup>th</sup> Lunar and Planetary Science Conference, Texas, 2009.

WAKEFIELD, G.; LIPSCOMB, S.; HOLLAND, E.; KNOWLAND, J. The effects of manganese doping on UVA absorption and free radical generation of micronised titanium dioxide and its consequences for the photostability of UVA absorbing organic sunscreen components. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 648-652, 2004.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: A review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**, v. 23, p. 31-47, 2010.

WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. *Ex vivo* evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 525-530, 2011.

WEIGMANN, H. J.; LADEMANN, J.; MEFFERT, H.; SCHAEFER, H.; STERRY, W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 12, p. 34-45, 1999.

WLASCHEK, M.; BRIVIBA, K.; STRICKLIN, G. P.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 194-198, 1995.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; NADERI, L.; MA, W.; SCHNEIDER, L. A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHÜLLER, J.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 41-51, 2001.

WOOD, S. R.; BERWICK, M.; LEY, R. D.; WALTER, R. B.; SETLOW, R. B.; Timmins, G. S. UV causation of melanoma in *Xiphophorus* is dominated by melanin photosensitized oxidant production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4111-4115, 2006.

**World Health Organization (WHO)**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 28 maio 2013.

WU, Y.; MATSUI, M. S.; CHEN, J. Z.; JIN, X.; SHU, C. M.; JIN, G. Y.; DONG, G. H.; WANG, Y. K.; GAO, X. H.; CHEN, H. D.; LI, Y. H. Antioxidants add protection to a broad-spectrum sunscreen. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 178-187, 2011.

XU, C. X.; GREEN, A.; PARISI, A.; PARSONS, P. G. Photosensitization of the sunscreen octyl p-dimethylaminobenzoate by UVA in human melanocytes but not in keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, p. 600-604, 2001.

YANG, J.; WILEY, C. J.; GODWIN, D. A.; FELTON, L. A. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 605-12, 2008.

YANISHLIEVA, N. V.; AITZETMÜLLER, K. RANEVA, V. G. Beta-Carotene and lipid oxidation. **Fett/Lipid**, v. 100, n. 10, p. 444-462, 1998.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 131-136, 2000.

YEH, S.-L.; WANG, W.-Y.; HUANG, C.-H.; HU, M.-L. Pro-oxidative effect of  $\beta$ -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 729-735, 2005.

YOUNG, A. R. Chromophores in human skin. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, p. 789-802, 1997.

YOUNG, A. R.; CHADWICK, C. A.; HARRISON, G. I.; NIKAIDO, O.; RAMSDEN, J.; POTTEN, C. S. The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, p. 982-988, 1998.

ZHANG, W.; FEI, Z.; ZHEN, H. N.; ZHANG, J. N.; ZHANG, X. Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. **Journal of Neuro-oncology**, v.81, p. 231-240, 2007.

ZILIUS, M.; RAMANAUSKIEN, K.; BRIEDIS, V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin *in vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2013.

ZONIOS, G.; DIMOU, A.; BASSUKAS, I.; GALARIS, D.; TSOLAKIDIS, A.; KAXIRAS, E. Melanin absorption spectroscopy: new method for non invasive skin investigation and melanoma detection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 1, p. 14-17, 2008.