UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação
fotoprotetora

Fernanda Maria Pinto Vilela

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora

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.

Orientada: Fernanda Maria Pinto Vilela

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto
2010

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.

Vilela, Fernanda Maria Pinto

Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora. Ribeirão Preto, 2010.
83 p.; 30cm.

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

Orientadora: Fonseca, Maria José Vieira.

1. Segurança. 2. Filtros solares. 3. Retenção cutânea. 4. Glutathione reduzida. 5. Metaloproteinases. 6. Mieloperoxidase. 7. Superóxido dismutase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Maria Pinto Vilela

Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora

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. Maria José
Vieira Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico aos meus pais Sérgio e
Miriam, à minha irmã Marcela
e ao meu namorado Filipe.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional, pelo apoio e incentivo sempre.

Aos professores Dr. Augusto César Cropanese Spadaro e Dr. Carlos Curti, pela disponibilidade de utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Às Dra. Yris Maria Fonseca e Dra. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini pela amizade e pelos preciosos ensinamentos.

Aos companheiros e amigos de laboratório André, Ana Luiza, Ana Claudia, Bruna, Carolina, Daniele, Glauco, Lívia, Mariana, Rebeca, Ricardo, Silvia e Vanessa, e aos amigos da pós-graduação Mariza, Juliana, Renata, Franciane, Stephânia Rodrigo e Thiago.

Ao técnico do laboratório de Controle de Qualidade, José Roberto Jabor, pela dedicação e amizade.

Aos funcionários Ana Elisa C. S. Azzolini, Patrícia Sper Simão e Reinaldo F. Batista, pelo auxílio técnico prestado.

Às funcionárias da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, Rosana Ferreira L.S. Florêncio, Ana Lúcia Turatti, Eleni Angeli Passos e Rossana Mingheli Ribeiro, pela eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados.

Aos funcionários da FCFRP-USP, em especial ao Sr. Antônio (Portaria) e Sra. Evanira (Copa), pelo auxílio e pelos momentos de boa convivência.

Aos meus familiares e amigos que torcem e vibram a cada conquista. À minha irmã Marcela pela força de todos os dias e ao meu namorado Filipe pela atenção, incentivo e compreensão.

Aos meus pais Sérgio e Miriam pelo amor, dedicação, apoio e por serem os principais responsáveis por mais esta conquista.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*"A vontade de se preparar
precisa ser maior que a
vontade de vencer"*

Bob Knight

RESUMO

VILELA, F.M.P. **Avaliação da segurança *in vivo* de filtros solares em formulação fotoprotetora.** 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Em decorrência da destruição da camada de ozônio pela poluição, a incidência da radiação ultravioleta sobre a Terra tem aumentado, e consequentemente, o número de casos de câncer de pele tem elevado cada vez mais. Diversos estudos têm demonstrado que os danos causados pela radiação solar à pele são causados frequentemente pela geração de radicais livres e ativação de mediadores do processo inflamatório. Estudos têm concluído que os filtros solares são capazes de penetrarem na pele e agirem como fontes de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando submetidos à radiação ultravioleta, o que leva a uma preocupação de que as moléculas fotoprotetoras podem ser geradoras de EROs ao invés de prevenir a formação dessas espécies pelo bloqueio da radiação solar. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos filtros solares 3-benzofenona (3-BZ), octilmetoxicinamato (OMC) e salicilato de octila (OS) na pele de camundongos sem pêlos submetida ou não à radiação UVB. Além disso, a retenção cutânea dos filtros solares foi avaliada *in vitro* utilizando pele de orelha de porco em células de difusão e *in vivo* em pele de camundongos sem pêlos. Os resultados de retenção cutânea *in vitro* demonstraram que a formulação gel creme promoveu maior retenção dos filtros solares na pele em comparação às formulações loção e creme. Além disso, a 3-BZ apresentou a maior retenção na pele quando comparadas as retenções dos filtros solares veiculados na mesma formulação. Todos os filtros solares penetraram na pele de camundongos sem pêlos após 1 hora da aplicação da formulação gel creme, o que garantiu a presença dos filtros solares na derme e epiderme no momento da exposição à radiação UVB. A formulação adicionada dos filtros solares preveniu em 76% a depleção de GSH induzida pela radiação UVB. Entretanto, o tratamento dos animais com a formulação contendo os filtros solares não foi capaz de impedir o aumento das atividades da metaloproteinase-9 e mieloperoxidases induzido pela radiação. Além disso, a utilização da formulação adicionada dos filtros solares em associação à exposição à radiação UVB provocou uma diminuição da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase presente na pele. Desta forma, considerando os parâmetros avaliados neste estudo, a formulação fotoprotetora parece não proteger a pele contra os danos causados pela radiação UVB quanto deveria. Além disso, estes filtros parecem ser instáveis frente à radiação o que comprometendo assim a eficácia e segurança dos mesmos.

Palavras-chave: segurança, filtros solares, retenção cutânea, glutathione reduzida, metaloproteinases, mieloperoxidase, superóxido dismutase.

ABSTRACT

VILELA, F.M.P. **Evaluation of *in vivo* safety of ultraviolet filters in sunscreen formulation.** 2010. 83 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Due to the destruction of the ozone layer by pollution, the incidence of ultraviolet radiation on Earth has enlarged and, consequently, the number of cases of skin cancer has increased even more. Several studies have shown that the damages caused by solar radiation to the skin are usually caused by free radical generation and activation of inflammatory mediators. Several studies have concluded that sunscreens are able to penetrate the skin and act as sources of formation of reactive oxygen species (ROS) under ultraviolet radiation exposition, leading, therefore, to the concern regarding the possibility of sunscreen molecules generate ROS instead of preventing the formation of these species by blocking sunlight. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of benzophenone-3 (3-BZ), octylmethoxycinnamate (OMC) and octyl salicylate (OS) sunscreens in the skin of hairless mice exposed or not to UVB radiation. Furthermore, the sunscreen skin retention was *in vitro* assessed using pig ear skin in diffusion cells and *in vivo* assessed using hairless mice. The results demonstrated that the cream gel rendered higher epidermal concentrations of the evaluated filters compared to the lotion and cream formulations. Comparing the skin retention amounts of each filter in the same formulation, 3-BZ showed higher skin retention ability than OMC and OS. In addition, all sunscreens penetrated the skin of hairless mice after 1 hour of the applied gel cream formulation, which guaranteed the presence of sunscreen in the dermis plus epidermis at the time of UVB exposure. The formulation of sunscreens prevented by 76% the GSH depletion induced by UVB radiation. However, the treatment of the animals with the sunscreens loaded-formulation was not able to inhibit the increase of metalloproteinase-9 and myeloperoxidase activities induced by radiation. Furthermore, the use of sunscreens loaded-formulation in combination with UVB radiation exposition caused the decrease in the amounts of the superoxide dismutase antioxidant enzyme present in skin. Thus, considering the parameters evaluated in this study, the sunscreens loaded-formulation does not seem to effectively protect skin against damages caused by UVB radiation as it was supposed to. Moreover, these filters seem to be unstable against the radiation and thus compromising their efficacy and safety.

Key words: safety, ultraviolet filters, skin retention, reduced glutathione, metalloproteinases, myeloperoxidase and superoxide dismutase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Célula de difusão tipo “Franz”	22
Figura 2. Estudo de retenção cutânea <i>in vivo</i>	23
Figura 3. Caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB	24
Figura 4. Cromatograma obtido a partir da injeção da solução padrão dos filtros solares 3-BZ (4 µg/mL); OMC (7,5 µg/mL) e OS (5 µg/mL).....	32
Figura 5. Cromatogramas correspondentes às retenções dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS em pele de orelha de porco veiculados nas formulações gel creme, creme e loção	38
Figura 6. Cromatogramas correspondentes às retenções em pele de orelha de porco das formulações gel creme, creme e loção sem adição dos filtros solares	38
Figura 7. Cromatogramas correspondentes às retenções em pele de camundongo sem pêlo da formulação gel creme adicionada dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS e da formulação gel creme placebo.....	42
Figura 8. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da formulação gel creme adicionada dos filtros solares pela recuperação dos níveis de GSH depletados	44
Figura 9. Avaliação do efeito da formulação gel creme adicionada dos filtros solares na atividade proteolítica em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina	47
Figura 10. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da formulação gel creme adicionada dos filtros solares pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO)	49
Figura 11. Avaliação da atividade da SOD na pele de camundongos sem pêlos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medida do pH das formulações armazenadas a 4° C após 7 dias a partir da manipulação	30
Tabela 2 – Avaliação da precisão, repetibilidade e precisão intermediária, das análises quantitativas dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS por CLAE	34
Tabela 3 – Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação creme utilizando a metodologia de CLAE	35
Tabela 4 – Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação loção utilizando a metodologia de CLAE	35
Tabela 5 – Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação gel creme utilizando a metodologia de CLAE	36
Tabela 6 – Determinação da recuperação do processo de extração dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados em pele de orelha de porco	37
Tabela 7 – Quantidades dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS retidas em pele de orelha de porco.....	38
Tabela 8 – Quantidades dos filtros solares retidos em pele de camundongos sem pêlos	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
3-BZ	3-Benzofenona
AMP	Aminometilpropanol
AP-1	Proteína ativadora-1
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CI	Controle irradiado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNI	Controle não irradiado
CO_2	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
EGTA	Etileno bis-glicol (β -amino-ester-etil) N,N,N',N'-ácido tetracético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FPS	Fator de proteção solar
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Rd	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxila
HTAB	Brometo de hexadecil trimetil-amônio
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IF	Irradiado tratado com a formulação contendo os filtros solares
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Irradiado tratado com a formulação placebo
logP	Coeficiente de partição

MMP	Metaloproteinase da matriz
MMP-1	Colagenase 1
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Estromelisina-1
MMP-9	Gelatinase B
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NIF	Não irradiado tratado com a formulação contendo os filtros solares
NIP	Não irradiado tratado com a formulação placebo
O ₂ ⁻	Superóxido
OMC	Octilmetoxicinamato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPT	O-ftalaldeído
OS	Salicilato de octila
p/p	Peso/peso
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de acidez
r	Coeficiente de correlação linear
PMNs	Polimorfonucleares
RUV A/B/C	Radiação ultravioleta A/B/C
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TIMP	Inibidor tecidual das metaloproteinases
TiO ₂	Dióxido de titânio
UV A/B/C	Ultravioleta A/B/C
UV/VIS	Ultravioleta/visível
v/p	Volume/peso
v/v	Volume/volume
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
 1. INTRODUÇÃO	 1
1.1. A radiação ultravioleta e os danos à pele	3
1.2. Filtros solares	8
1.3. Estudo de penetração cutânea	9
 2. OBJETIVOS	 14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 15
3.1. Preparo das formulações	15
3.2. Caracterização físico-química das formulações	16
3.2.1. Centrifugação	16
3.2.2. Determinação do pH	16
3.3. Metodologia analítica para quantificação dos filtros solares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	17
3.3.1. Preparo da solução padrão	17
3.4. Validação da metodologia de CLAE	18
3.4.1. Seletividade.....	18
3.4.2. Linearidade.....	18
3.4.3. Precisão	18
3.4.4. Exatidão	19
3.5. Estudos de penetração cutânea <i>in vitro</i>	20

3.5.1. Avaliação da recuperação dos filtros solares extraídos de amostras de pele	20
3.5.2.. Estudo de retenção cutânea <i>in vitro</i>	21
3.6. Estudo de retenção cutânea <i>in vivo</i>	23
3.7. Avaliação da segurança <i>in vivo</i> dos filtros solares em formulação fotoprotetora	24
3.7.1. Irradiação dos camundongos sem pêlos	24
3.7.2 Quantificação do antioxidante endógeno GSH	25
3.7.3 Análise qualitativa da atividade das metaloproteinases	26
3.7.4. Avaliação da eficácia antiinflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase	27
3.7.5. Avaliação da atividade da superóxido dismutase <i>in vivo</i>	28
3.8. Análise estatística dos resultados	29
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 30
 4.1 Caracterização físico-química das formulações	 30
4.1.1 Centrifugação	30
4.1.2 Determinação do valor de pH	30
4.2. Metodologia analítica para quantificação dos filtros solares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	31
4.3. Validação da metodologia de CLAE	32
4.3.1. Seletividade	33
4.3.2. Linearidade	33
4.3.3. Precisão	33
4.3.4. Exatidão	34
4.4. Estudos de penetração cutânea <i>in vitro</i>	36
4.4.1. Avaliação da recuperação dos filtros solares extraídos de amostras de pele	36
4.4.2. Estudo de retenção cutânea <i>in vitro</i>	37
4.5. Estudo de retenção cutânea <i>in vivo</i>	41
4.6. Avaliação da segurança <i>in vivo</i> dos filtros solares em formulação fotoprotetora	43

4.6.1 Quantificação do antioxidante endógeno GSH	43
4.6.2 Análise qualitativa da atividade das metaloproteinases	45
4.6.3. Avaliação da eficácia antiinflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase	48
4.6.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase <i>in vivo</i>	50
 5. CONCLUSÃO	 54
 6. REFERÊNCIAS	 55
 ANEXO	 66

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo e as respostas inflamatórias induzidas pela radiação ultravioleta (RUV) podem proporcionar uma variedade de efeitos deletérios à pele humana, incluindo a indução de fotoenvelhecimento prematuro, supressão do sistema imune e a geração de câncer de pele, atuando como iniciadora e promotora de tumores (HALLIDAY, 2005; HANSON; CLEGG, 2002; TOUITOU; GODIN, 2008).

Atualmente, o câncer de pele pode ser considerado o maior e o mais crescente problema de saúde pública. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer - INCA (2007), o câncer mais frequente é o câncer de pele, correspondendo a aproximadamente 25% de todos os tumores diagnosticados, sendo a RUV o seu maior agente etiológico.

Como parte das práticas para reduzir os efeitos carcinogênicos e fotodanos da radiação solar, é recomendado o uso de bloqueadores solares contendo filtros ultravioleta (UV). No entanto, o aumento do uso de bloqueadores solares tem coincidido com o aumento do câncer de pele, mais notadamente o melanoma (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer) da Organização Mundial da Saúde (OMS) reuniu um grupo de pesquisadores visando o estabelecimento de estratégias de fotoproteção para a população. A recomendação da IARC à população foi evitar a exposição ao sol e usar vestimentas para a proteção contra a RUV. O uso de bloqueadores solares foi indicado com ressalva devido à falta de estudos que comprovem a sua fotoestabilidade.

Dados da literatura mostram que diversos filtros solares, dentre eles a 3-benzofenona (3-BZ), o octilmetoxicinamato (OMC) e o salicilato de octila (OS), penetram através do estrato córneo e são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma dos queratinócitos nucleados na epiderme. O entendimento limitado sobre as reações fotoquímicas dos filtros solares na pele, as quais são induzidas ou mediadas por EROs, complica ainda mais o uso de bloqueadores solares para fotoproteção (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006).

Outros estudos demonstraram que o uso do filtro solar promove um tempo de exposição maior das pessoas à radiação ultravioleta. As pessoas sentem-se mais protegidas devido à proteção dos filtros solares contra o eritema e por isso

prolongam o tempo de exposição ao sol (AUTIER et al., 1999; GIL; KIM, 2000). No entanto, considerar o eritema como a única resposta *in vivo* à radiação UV pode não refletir a ação protetora dos filtros solares contra as outras respostas como a imunossupressão, depleção do sistema antioxidante da pele, aumento de metaloproteinases, fotoenvelhecimento e carcinogênese.

Com o objetivo de diminuir o número de casos de câncer de pele no Brasil, foram criados projetos de lei que incluem o filtro solar na lista de medicamentos distribuídos pelos programas de dispensação de medicamentos do Sistema Único de Saúde. A principal preocupação é voltada aos trabalhadores que trabalham ao ar livre e por isso permanecem muito tempo expostos ao sol, como os construtores, pedreiros, carteiros, garis, feirantes, trabalhadores da indústria sucroalcooleira, entre outros.

Diante disso, torna-se necessária uma maior preocupação com relação à segurança da utilização desses protetores solares, por se tratar de um produto que fica em contato com extensas superfícies da pele e durante períodos de tempo prolongados (TOUITOU; GODIN, 2008).

O estudo dos níveis do antioxidante endógeno GSH, da atividade das metaloproteinases e mieloperoxidases e da enzima antioxidante superóxido dismutase na pele submetida à ação dos filtros solares, exposta ou não à radiação UV, contribuirá para a avaliação do efeito do filtro solar como indutor de danos à pele. É importante ressaltar que os danos causados ao sistema antioxidante da pele não são necessariamente provenientes somente dos radicais livres, por isso não podemos afirmar que a depleção do sistema antioxidante foi causada pelo aumento de espécies reativas. No entanto, a destruição do sistema antioxidante indica a possibilidade de maior dano protéico, o que torna a pele vulnerável a posteriores estresses oxidativos de quaisquer fontes.

É necessário melhor conhecimento sobre o comportamento dos filtros solares na pele: a penetração, a possível depleção do sistema antioxidante quando a pele tratada com a formulação fotoprotetora é submetida à radiação UV, ou se a formulação por si só, isto é, sem ser submetida à radiação, é capaz de causar alterações no sistema antioxidante e nas atividades das metaloproteinases e mieloperoxidases presentes na pele.

Assim, é necessária uma melhor compreensão do comportamento físico-químico das moléculas utilizadas como filtros solares, como também são

necessários estudos *in vivo* que investiguem os efeitos indutores de danos à pele por esses filtros solares expostos ou não à radiação ultravioleta.

1.1. A radiação ultravioleta e os danos à pele

A pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre esses agentes, a radiação ultravioleta merece grande destaque. A RUV é dividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm). A energia solar proveniente dessa radiação é absorvida pelos cromóforos celulares como o DNA, porfirinas, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos que são capazes de absorver essa energia e convertê-la em energia química. Esses cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs, dentre os quais podemos destacar os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) e superóxido (O_2^-), os radicais peroxila e alcóxila, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos. Além das EROs, também estão envolvidas em processos redox as espécies reativas de nitrogênio e de enxofre, com importância biológica significativa (GUARANTINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; XU; FISHER, 2005).

Para proteção contra os efeitos nocivos das EROs, a pele possui um mecanismo de defesa antioxidante cutâneo formado por substâncias antioxidantes enzimáticas, dentre as quais se destacam as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), e não-enzimáticas como a glutathiona (GSH), ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e vitamina A. A enzima superóxido dismutase é uma enzima antioxidante que converte o ânion superóxido altamente reativo em O_2 e H_2O_2 . A catalase e a glutathiona peroxidase são as principais enzimas responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 (MATÉS; GOMES; CASTRO, 1999; RASILAINEN et al., 2002).

A redução das defesas antioxidantes da pele devido à exposição à radiação UV já foi relatada por diversos pesquisadores. Shindo e colaboradores (1993) demonstraram que, após a irradiação de camundongos sem pêlos com a radiação UV (UVA + UVB), com a dose de 25 J/cm^2 , que corresponde a dez vezes a dose eritematosa mínima, as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase sofreram um grande decréscimo na derme e epiderme. Os antioxidantes α -tocoferol,

9-ubiquinol, 9-ubiquinona, ácido ascórbico, ácido dihidroascórbico e glutathione reduzida também sofreram decréscimos de 26-93%. Pence e Naylor (1990) verificaram que a atividade da enzima superóxido dismutase sofreu um decréscimo significativo após 12 horas de uma única exposição de camundongos sem pêlos à radiação UVB e manteve-se suprimida por mais de 72 horas após essa exposição.

A GSH é um dos mecanismos de defesa endógeno mais importantes contra as espécies reativas induzidas pela radiação UV, é um componente não enzimático juntamente com o ácido ascórbico e a 9-ubiquinona. É um tripeptídeo constituído de γ -glutâmico, cisteína e glicina e é o antioxidante mais presente na maioria dos tecidos, inclusive na pele (AFAQ; MUKHTAR, 2001; CARINI et al., 2000). A glutathione pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Atua como sequestrador direto dos radicais livres pela transferência de hidrogênio, atuando como cofator para a enzima GSH-peroxidase, que sequestra os peróxidos e regenera as vitaminas C e E (AFAQ; MUKHTAR, 2001; CARINI et al., 2000). Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathione redutase (GSH-Rd) em uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção natural. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Com a exposição à radiação UVB, o conteúdo de GSH é significativamente reduzido induzindo um aumento nos níveis de EROs (HO et al., 2005).

Sob tensão normal de oxigênio esses mecanismos de defesa antioxidantes são suficientes para manter a homeostasia, removendo os radicais livres produzidos. No entanto, sob circunstâncias que promovem aumento do estresse oxidativo, a concentração de radicais livres aumenta incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo, em favor do primeiro (SIERENS et al., 2001). Baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio podem ser benéficas ou até mesmo indispensáveis nos processos de sinalização celular e na defesa

contra microrganismos. No entanto, a presença em altas concentrações e/ou a remoção inadequada dessas EROs podem levar à disfunções metabólicas e danos às macromoléculas biológicas (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999)

Estudos que examinaram as diferentes influências das radiações UVA e UVB na geração de EROs mostraram que 20% do total da intensidade dos radicais livres determinada foi gerada exclusivamente na epiderme pela radiação UVB, enquanto que os raios UVA foram responsáveis pela geração dos 80% restantes. A densidade de radicais livres é muito maior na epiderme do que na derme (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006). Outro trabalho demonstrou que a maioria dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos está presente também em maiores concentrações na epiderme do que na derme (SHINDO et al., 1994; SHINDO; WITT; PACKER, 1993).

A exposição à radiação UV causa depleção do sistema antioxidante de proteção natural fazendo com que os efeitos deletérios não sejam completamente prevenidos, resultando em danos oxidativos ao DNA. Esses danos são causados em várias estruturas celulares como os ácidos nucleicos, proteínas e nos lipídios dos vários estratos da pele. As espécies reativas de oxigênio também podem desencadear uma série de cascatas de citocinas produzindo respostas inflamatórias responsáveis pelo fotoenvelhecimento; induzem a síntese das metaloproteinases, que causam a degradação do colágeno levando à formação de rugas; causam disfunções nos melanócitos produzindo hiperpigmentação da pele; oxidação lipídica; mutação nos genes e imunossupressão (HALLIDAY, 2005; HANSON; CLEGG, 2002; TOUITOU; GODIN, 2008).

As metaloproteinases da matriz (MMP) são uma família de zinco endopeptidases capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular como proteínas, proteinases, outras metaloproteinases, inibidores de proteinases, fatores de crescimento, proteínas ligadas aos fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, receptores celulares de membrana e moléculas de adesão celular. As MMPs controlam a migração, proliferação e apoptose celular e regulam a expansão tumoral e a angiogênese. Estão relacionadas ao remodelamento dos componentes da matriz extracelular, por meio da degradação do colágeno, da elastina e da fibronectina. Participam também do processo de migração de células normais, malignas e inflamatórias (BONAMIGO; PEUKERT; BERTI, 2001; SOUNNI; NOEL, 2005).

A radiação ultravioleta ativa o fator de crescimento e receptores de citocinas nas superfícies de queratinócitos e fibroblastos. Os receptores ativados estimulam as cascatas de transdução do sinal induzindo a transcrição do fator AP-1, que estimula a transcrição dos genes das metaloproteinases da matriz. Nos fibroblastos, o fator AP-1 inibe a expressão do gene do pró-colágeno. As MMPs são secretadas pelos queratinócitos e fibroblastos e degradam o colágeno e outras proteínas que constituem a matriz extracelular da derme. O reparo imperfeito dos danos causados na derme danifica a integridade funcional e estrutural da matriz extracelular. A repetida exposição ao sol causa um acúmulo dos danos à pele resultando em enrugamento, característica da pele danificada pela radiação (FISHER et al., 2002).

O colágeno é o componente extracelular mais abundante na derme, contribui com 80% do peso seco da pele e confere as propriedades de extensibilidade (OXLUND; ANDREASSEN, 1980). Principalmente quatro MMPs são importantes na degradação da matriz extracelular da pele: a collagenase MMP-1, as gelatinases MMP-2 (92 kDa) e MMP-9 (72 kDa) e a estromelina-1 (MMP-3). Juntas, essas metaloproteinases podem degradar completamente o colágeno da pele e as principais proteínas estruturais que compõem o tecido conectivo da derme (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993).

As collagenases são as únicas MMPs capazes de hidrolisar as fibras de colágeno intactas. A collagenase MMP-1 é a mais importante no processo de degradação, degrada as fibras de colágeno tipo I e III. O colágeno tipo I é o principal componente do tecido conectivo, confere elasticidade e consistência à matriz celular, e o colágeno tipo III está presente em menores quantidades formando uma rede juntamente com as fibras de colágeno tipo I (HO et al., 2005; TALLEC; KORWIN-ZMIJOWSKA; DOLPHE, 1998, XU; FISHER, 2005). As gelatinases MMP-2 e MMP-9 têm o potencial de degradar a rede de fibras elásticas e o colágeno que já foi parcialmente degradado. A MMP-9 tem uma grande atividade elastolítica e na degradação da fibrilina, uma glicoproteína essencial para a formação das fibras elásticas; enquanto que a MMP-2 possui maior especificidade sobre a degradação do colágeno tipo III e dos constituintes da junção entre a derme e a epiderme (BERTON et al., 2000).

O principal mecanismo no qual a radiação UV causa danos ao tecido conectivo, que está associado com o fotoenvelhecimento, é via indução de MMPs. A expressão basal dessas enzimas na pele é relativamente baixa, entretanto, elas

podem ser aumentadas pela radiação tanto *in vivo* quanto em cultura de células. As radiações ultravioleta UVA e UVB são indutoras da secreção e ação das gelatinases, principalmente da MMP-9. A ação dessas radiações isoladamente é mais acentuada do que quando realizada em combinação, e a UVB é mais estimulante da MMP-9 do que a UVA. Sob condições fisiológicas normais, a atividade das metaloproteinases é regulada pelo inibidor tecidual das MMPs (TIMPs). Na pele humana, a radiação UV induz um aumento significativo nas quantidades de TIMP-1 (inibidor da MMP-9) e TIMP-2 (inibidor da MMP-2). No entanto, a indução das MMPs pela radiação UV excede ao da indução do TIMP levando a um desequilíbrio entre as quantidades de MMP e TIMP promovendo a degradação das proteínas da matriz extracelular. Essa degradação, juntamente com os reparos imperfeitos, causa um acúmulo de fragmentos de colágeno na derme danificando sua integridade estrutural, que é considerado o principal fator de contribuição para o envelhecimento (BONAMIGO; PEUKERT; BERTI, 2001, FLIGIEL et al., 2003; JENKINS, 2002; XU; FISHER, 2005;).

A radiação UV aumenta também os níveis de mieloperoxidase (MPO), uma enzima peróxido de hidrogênio oxidoredutase presente nos neutrófilos, que é usada como um biomarcador para avaliar a resposta inflamatória para um número bem caracterizado de irritantes da pele e promotores de tumor (CASAGRANDE et al., 2006; TRUSH et al., 1994; VICENTINI et al., 2008). Durante a ação dos neutrófilos no organismo, elétrons são transferidos do oxigênio pela enzima NADPH oxidase para o fagossomo ou para o meio extracelular gerando o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atuam como desencadeantes da formação de outros radicais mais potentes. A geração desses radicais mais potentes é dependente da presença da mieloperoxidase, que juntamente com o peróxido de hidrogênio forma halógenos oxidados, como o ácido hipocloroso (HClO) que são efetivos contra microrganismos e células tumorais (FREIRE; QUELUZ, 1995).

Para limitar a exposição à radiação solar é recomendado proteger a pele com vestimentas, não ficar exposto ao sol entre 11 e 15 horas e usar protetor solar com um fator de proteção solar (FPS) igual ou superior a 15. No entanto, o aumento do uso do protetor solar está coincidindo com o aumento da incidência do câncer de pele. Existem evidências de que o potencial nocivo é consequência da indução da reatividade química pela radiação UV dos constituintes dos protetores. Tem-se atribuído efeitos adversos aos compostos orgânicos usados nas formulações

fotoprotetoras, inclusive a formação de componentes promotores do câncer (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007).

O aumento da incidência do melanoma também tem sido atribuído à capacidade do protetor solar retardar a queimadura na pele, gerando uma falsa sensação de segurança, o que leva a um prolongamento da exposição à radiação ultravioleta (GIL; KIM, 2000). Autier e colaboradores (1999) realizaram um estudo epidemiológico que avaliou os hábitos de exposição solar e sugeriram que o uso de protetor solar com alto fator de proteção solar aumenta a duração da exposição ao sol.

1.2. Filtros solares

Existem duas classes de filtros solares: orgânicos (comumente denominados químicos) e inorgânicos (comumente denominados físicos). Nos filtros orgânicos estão presentes compostos orgânicos, enquanto que nos inorgânicos estão presentes os óxidos metálicos. Geralmente, os compostos orgânicos protegem a pele pela absorção da radiação e os inorgânicos, pela reflexão. Os filtros físicos compreendem os óxidos metálicos, como o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) que são muito eficientes, fotoestáveis, e oferecem proteção na faixa de comprimento de onda que vai do UVA até o visível com potencial de irritação e sensibilização quase insignificante. No entanto, essas moléculas quando aplicadas na pele causam um branqueamento indesejável (ANTONIOU et al., 2008).

Os filtros orgânicos são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV altamente energética e transformá-la em radiações menos energéticas e inofensivas ao ser humano. Estas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos aceptores de elétrons, e no geral, apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila na posição orto ou para do anel aromático (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Os filtros solares orgânicos são cromóforos, isto é, absorvem a energia da radiação UV e da luz visível e convertem essas energias em uma energia eletrônica excitatória (BONDA, 2008).

Enquanto há absorção da radiação UV, ocorre deslocamento de elétrons na molécula do filtro solar causando uma excitação de um estado estável menos energético para outro de maior energia. Após essa excitação, os elétrons retornam

ao estado inicial de maior estabilidade e menor energia emitindo uma quantidade de energia menor em magnitude do que a energia inicialmente absorvida para causar a excitação (WOLF et al., 2001).

A eficiência de uma formulação fotoprotetora é estimada pelo FPS, o qual depende do conteúdo dos filtros UV na formulação. A necessidade de promover alto fator de proteção solar e uma grande eficiência contra as radiações UVA e UVB simultaneamente tem levado ao desenvolvimento de formulações contendo diferentes combinações de filtros solares químicos. Dos filtros solares químicos permitidos para o uso, a 3-benzofenona (oxibenzona), o octilmetoxicinamato, a avobenzona, o salicilato de octila e o homossalato são os agentes mais utilizados em formulações fotoprotetoras (SARVEIYA; RISK; BENSON, 2004).

Os salicilatos absorvem a radiação UVB, são muito estáveis e insolúveis em água. As reações de sensibilização e irritação na pele devido ao uso dos salicilatos são raras. O salicilato de octila e o homossalato são comumente utilizados para melhorar a substantividade da formulação e reduzir a fotodegradação de outros filtros solares como a 3-benzofenona. O octilmetoxicinamato, dentre os cinamatos é o filtro UVB mais utilizado no mundo. É frequentemente utilizado em combinação com outros filtros com o objetivo de alcançar um FPS maior no produto final. No entanto, após a exposição à luz solar o octilmetoxicinamato sofre degradação gerando um produto com menor habilidade de absorver a radiação ultravioleta (ANTONIOU et al., 2008).

As benzofenonas absorvem de forma eficiente as radiações UVA e UVB, porém, as reações de sensibilização da pele são mais comuns quando comparadas com outros filtros solares. A 3-benzofenona é a benzofenona mais comumente utilizada em formulações fotoprotetoras (ANTONIOU et al., 2008; GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008; NASH, 2006).

1.3. Estudo de penetração cutânea

A pele está envolvida em numerosos processos físicos e bioquímicos, sendo o mais importante deles a função protetora, prevenindo tanto a passagem de substâncias exógenas estranhas como a perda de líquidos do corpo. É composta de três regiões funcionalmente distintas: epiderme, derme e hipoderme. A habilidade de proteger o corpo reside, sobretudo, na epiderme. Esta é avascularizada e constituída

de um epitélio estratificado, escamoso e queratinizado, o qual possui dimensões variadas dependendo da região corporal. A epiderme está apoiada sobre a membrana basal que é aderida a derme, sendo esta membrana basal responsável pelo fornecimento de nutrientes. A epiderme é a camada da pele mais ativa metabolicamente, com alto consumo de oxigênio e contém muitas oxidases e oxigenases envolvidas no metabolismo de xenobióticos. Por razões anatômicas, é muito exposta ao meio externo, aos riscos químicos ocupacionais e à radiação ultravioleta (GOMES; REIS, 2003; HERRLING; JUNG; FUCHS, 2006).

A diferenciação das células presentes na camada basal conduz à formação do estrato córneo, camada mais externa e responsável pela baixa permeabilidade cutânea. O estrato córneo é constituído por queratinócitos, células desprovidas de muitas organelas e de atividade mitótica e, ainda, de um cimento intercelular rico em lipídios (GOMES; REIS, 2003). A habilidade de uma molécula penetrar no estrato córneo depende de vários parâmetros físico-químicos como a massa molecular, lipofilicidade, polaridade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, solubilidade e no caso de ácidos e bases, do valor de pKa (VARVARESOU, 2006). A passagem de substâncias através do estrato córneo ocorre por difusão passiva e na maioria das vezes esse processo ocorre muito lentamente (NIELLOUD; MARTI-MESTRES, 2000).

A derme está acima da hipoderme, e constitui-se de tecido conjuntivo composto de fibroblastos, fibras colágenas e reticulíneas, na qual se situam os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. O suprimento vascular da derme regula a temperatura, pressão, nutrição e remove produtos do metabolismo (BARRY, 1983; CHIEN, 1992). O elevado volume sanguíneo na pele age como condição “sink” para moléculas que sofreram difusão e atingiram os capilares, mantendo baixas as concentrações de substâncias que penetraram na derme, maximizando o gradiente de concentração na epiderme promovendo desta forma a absorção percutânea (AULTON, 2002).

A hipoderme é composta de células adiposas e serve principalmente como fonte de energia, proteção mecânica e como um isolamento térmico contribuindo para a função reguladora da temperatura da pele (NIELLOUD; MARTI-MESTRES, 2000).

No que diz respeito às propriedades de absorção e penetração cutânea das substâncias na pele, metodologias *in vitro* e *in vivo* são adequadas, no entanto, os experimentos *in vitro* são preferidos por razões éticas e de disponibilidade. Para determinar as quantidades de substâncias capazes de penetrar na pele é utilizado o método de difusão em células de Franz que é constituído por dois compartimentos separados por um disco de pele humana ou de porco. O compartimento inferior é constituído de um fluido receptor que simula a circulação sanguínea. A substância teste é colocada sobre o disco de pele e a difusão através da pele é medida pela análise do líquido receptor e as camadas da pele são analisadas separadamente (VARVARESOU, 2006).

Apesar das preocupações éticas, o uso de animais ou de modelos de pele isolados de animais para avaliar a absorção cutânea de moléculas é frequentemente relatado. Esses modelos, geralmente mais disponíveis do que a pele humana, tem grande importância na pesquisa básica para aprimorar o entendimento dos processos de penetração de vários agentes através da pele. Diversos modelos animais têm sido sugeridos como substitutos da pele humana e usados para avaliar a permeação cutânea de moléculas. O modelo animal mais relevante é o porco, cuja pele possui propriedades bioquímicas e histológicas similares ao da pele humana e é facilmente obtida de abatedouros. A pele de orelha de porco é adequada para estudos de permeação e fornece resultados comparáveis com os da pele humana (GODIN; TOUITOU, 2007). Devido ao fato de que a difusão passiva é a principal rota de penetração, a viabilidade da pele não é requisito para o teste de penetração cutânea (DIEMBECK et al., 1999).

Deve-se considerar que as formulações fotoprotetoras são aplicadas em uma grande área da superfície da pele, geralmente maior que 1,5 m² de superfície corporal, e ficam em contato com a pele por longos períodos, o que permite uma constante e elevada penetração de substâncias químicas através do estrato córneo e conseqüentemente na circulação sistêmica (TOUITOU; GODIN, 2008).

É importante ressaltar que o agente fotoprotetor deve permanecer na superfície da pele, impregnar-se no estrato córneo e criar uma barreira contra a radiação UV protegendo a pele sem penetrá-la para que não ocorra uma exposição sistêmica a essas substâncias. O estrato córneo contribui para limitar a penetração cutânea de substâncias orgânicas de alta e baixa massa molecular (KLINUBOL; ASAWANONDA; WANICHWECHARUNGRUANG, 2008).

Devido à presença de proteínas e de uma camada bilipídica, a pele possui sítios lipofílicos e hidrofílicos. Para se obter uma boa penetração na pele, o coeficiente de partição octanol/água ($\log P_{o/a}$) da molécula deve estar compreendido na faixa de 2-5, no entanto, para se obter um fluxo máximo, o coeficiente de partição ótimo deve ser 1. Com esses valores de $\log P_{o/a}$ o balanço hidrófilo-lipófilo é suficiente para permitir a difusão passiva das moléculas através da pele. Se a molécula tiver um valor de coeficiente de partição muito baixo, devido à alta solubilidade em água não atravessará a barreira do estrato córneo. Por outro lado, se o coeficiente de partição for muito alto, isto é, muito lipossolúvel, a molécula permanecerá dissolvida no estrato córneo e não atingirá os tecidos da epiderme viável ricos em água (BARRY, 1983; DURAND et al., 2009).

A substantividade da molécula, isto é, a habilidade de uma substância ser adsorvida ou absorvida em substratos queratinosos minimiza a penetração cutânea. O desenvolvimento de formulações e a síntese de novas moléculas fotoprotetoras com boa substantividade tem sido de grande interesse com o objetivo de diminuir a absorção cutânea e garantir a segurança das formulações fotoprotetoras (ANSELMi et al., 2002; BARRY, 1983; MONTI et al., 1993).

De acordo com a Lei de Fick, o fluxo máximo de penetração através da pele, o qual pode ser alcançado após a aplicação de um veículo saturado, é basicamente determinado por quatro fatores: a difusão no estrato córneo, a espessura do estrato córneo, a lipofilicidade da substância em termos de coeficiente de partição entre a pele e o veículo e a solubilidade do princípio ativo no veículo (BARRY, 1983; VARVARESOU, 2006).

Além de absorver a radiação ultravioleta incidente, a formulação contendo o filtro solar deve ser estável na pele e ao calor, e fotoestável sob a luz do sol para permitir proteção durante várias horas sem a formação de produtos de degradação. Paralelamente, os filtros solares não devem ser irritantes, sensibilizantes ou tóxicos, já que comprovadamente são absorvidos traços destes através da pele. Além disso, o filtro solar deve ser resistente à água e compatível com formulações cosméticas (NOHYNEK; SCHAEFER, 2001; VARVARESOU, 2006).

Janjua e colaboradores (2004) estudaram a permeação dos filtros orgânicos 3-benzofenona, octilmetoxicinamato, e 3-(4-metilbenzilideno) na pele e seus efeitos nas concentrações dos hormônios reprodutivos em humanos a partir de experimentos *in vivo*. Não foram observados efeitos significativos nos níveis de

hormônios, mas foram detectados os três compostos no plasma e na urina, o que comprovou que ocorre a permeação desses filtros através da pele.

Gonzales et al. (2006), investigaram a excreção da 3-benzofenona (3-BZ) na urina de voluntários que aplicaram na pele um protetor solar comercial contendo esse filtro solar duas vezes ao dia no período de cinco dias. A quantidade total de 3-BZ excretada na urina durante o período de 10 dias a partir do início das aplicações variou de 1,2 a 8,7% da quantidade total aplicada. A penetração na epiderme dos filtros 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila foi observada em estudos realizados por Treffel e Gabard (1996).

Outro estudo verificou os níveis de EROs na epiderme nucleada após a aplicação dos filtros 3-benzofenona, octocrileno e octilmetoxicinamato na pele. Os resultados mostraram que a penetração dos três filtros nas camadas nucleadas da pele provocou um aumento nos níveis de EROs maior do que o aumento causado pela produção natural dessas espécies pelos cromóforos da epiderme quando submetidos à radiação UV. Além disso, concluiu-se neste estudo que os filtros aplicados na superfície da pele não só perdem sua capacidade de proteção como também agem como fontes de formação de EROs, o que têm criado uma preocupação de que as moléculas fotoprotetoras são incompletas contra as EROs e além disso podem gerar essas espécies quando submetidas à radiação UV (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vivo* a segurança dos filtros solares 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila presentes em formulações fotoprotetoras.

2.2. Objetivos específicos

Preparar formulações tópicas adicionadas dos filtros solares 3-benzofenona (4%), octilmetoxicinamato (7,5%) e salicilato de octila (5%).

Estudar a retenção *in vitro* dos filtros solares em pele da orelha de porco, empregando-se célula de Franz e *in vivo* utilizando camundongos sem pêlos.

Desenvolver e validar o procedimento de extração dos filtros solares da pele viável.

Estudar os efeitos do uso de uma formulação fotoprotetora contendo os filtros solares 3-benzofenona (3-BZ), octilmetoxicinamato (OMC) e salicilato de octila (OS), comumente utilizados em formulações comerciais, por medida da atividade da enzima superóxido dismutase, avaliação da secreção/atividade das metaloproteinases e mieloperoxidases, e sobre o antioxidante endógeno glutathione redutase (GSH) na pele viável de camundongos sem pêlos submetidos ou não à ação da radiação UV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo das formulações

As formulações fotoprotetoras disponíveis no comércio geralmente são adicionadas de vários filtros químicos, filtros físicos como o óxido de zinco e dióxido de titânio, vitamina E, extratos vegetais de aloe vera, soja, jojoba, entre outros. Devido ao fato das formulações comerciais conterem componentes que certamente interfeririam nos resultados *in vivo*, foram preparadas as formulações fotoprotetoras utilizadas nesse estudo com o objetivo de se eliminar os interferentes e de obter formulações placebo para serem utilizadas para fins de comparação.

Foram preparadas três formulações do tipo creme, loção e gel creme contendo os filtros solares orgânicos 3-benzofenona (4%), octilmetoxicinamato (7,5%) e salicilato de octila (5%). As emulsões utilizadas no estudo foram constituídas de uma fase aquosa e outra oleosa. Os componentes das fases aquosa e oleosa foram pesados e aquecidos separadamente até que a fase aquosa atingisse 75 °C e a fase oleosa 70 °C. As emulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases vertendo-se a fase aquosa na fase oleosa sob constante agitação.

Os filtros solares foram incorporados após 24 horas da manipulação das formulações. O filtro solar 3-benzofenona (4%) foi triturado em gral com 5% de propilenoglicol antes de ser adicionado às bases e os filtros octilmetoxicinamato (7,5%) e o salicilato de octila (5%) foram adicionados diretamente. Foram reservadas as formulações placebo contendo todos os componentes exceto os filtros solares. As formulações foram acondicionadas em potes plásticos, opacos, com capacidade para 50 g e conservados a 4°C.

Creme

A fase oleosa constituiu-se de álcool cetílico 3,5 % (p/p), ácido esteárico 4 % (p/p), monoestearato de glicerila 5,5 % (p/p), cera emulsionante não iônica (Polawax®) 3 % (p/p) e propilparabeno 0,05 % (p/p). A fase aquosa foi constituída de metilparabeno 0,05 % (p/p), EDTA 0,15 % (p/p), propilenoglicol 10 % (v/p) e água

destilada q.s.p. 100% (p/p). Após repouso de 24 horas, o pH foi acertado para 6,0 com aminometilpropanol (AMP) q.s.

Loção

A fase oleosa constituiu-se de álcool cetílico 1,5 % (p/p), ácido esteárico 1,5 % (p/p), monoestearato de glicerila 3,5 % (p/p), Polawax[®] 1 % (p/p) e propilparabeno 0,025 % (p/p). A fase aquosa foi constituída de metilparabeno 0,25 % (p/p), EDTA 0,15 % (p/p), propilenoglicol 5 % (v/p) e água destilada q.s. 100% (p/p). Após repouso de 24 horas, o pH foi acertado para 6,0 com AMP q.s.

Gel creme

O gel creme foi preparado a partir de uma mistura 1:1 do gel base de Carbopol[®] 1% com o creme (preparo descrito anteriormente). O gel base de Carbopol[®] foi preparado dissolvendo-se separadamente o metilparabeno 0,3 % (p/p) em propilenoglicol 5% (v/p) e o carboxipolimetileno (Carbopol[®]) 1% (p/p) em água destilada 40% (v/p). A mistura do metilparabeno e propilenoglicol foi vertida no Carbopol[®] dissolvido em água destilada e deixada em repouso por 24 horas. Após o repouso foi adicionado água destilada q.s.p. 100% e o AMP aos poucos sob agitação até que se atingisse o pH 6,0.

3.2. Caracterização físico-química das formulações

3.2.1. Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado utilizando-se 2,0 g de cada amostra adicionadas ou não dos filtros solares em centrífuga Excelsa baby I[®] (Fanem, SP, Brasil) a 1660 g durante 30 minutos e em seguida avaliou-se visualmente a amostra para verificar a ocorrência de separação das fases (MAIA CAMPOS; BADRA, 1992).

3.2.2. Determinação do pH

As formulações creme, gel-creme e loção adicionadas ou não dos filtros solares foram diluídas a 10% em água deionizada e o valor de pH foi determinado

em temperatura ambiente (25 °C) utilizando-se peagômetro Digimed DM20 (Digimed, SP, Brasil) previamente calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0 (DI MABRO; FONSECA, 2005).

3.3. Metodologia analítica para quantificação dos filtros solares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para análise cromatográfica dos filtros solares 3-benzofenona (Eusolex 4360[®], Merck), octilmetoxicinamato (Eusolex 2292[®], Merck) e salicilato de octila (Eusolex OS[®], Merck) foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu (Kioto, Japão), modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador modelo C-R6A e injetor Rheodyne. Foi utilizada coluna SupelcosilTM LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck). O método cromatográfico foi desenvolvido a partir de modificações dos métodos de Gaspar e Maia Campos (2006) e Santoro et al., (2005). A fase móvel constituiu-se por metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1% em fluxo de 1,0 mL/min. O volume injetado foi de 20 µL e a detecção foi feita no comprimento de onda de 305 nm. Todas as soluções e solventes foram filtrados através da membrana filtrante Millipore[®], 0,45 µm e os solventes degaseificados por sonicação a vácuo antes do uso.

3.3.1. Preparo da solução padrão

Amostras de 0,025 g dos filtros solares foram diluídas separadamente em 25 mL de fase móvel. As soluções foram submetidas ao processo de ultrassonicação em temperatura ambiente durante 15 minutos. Alíquotas de 1 mL de cada uma dessas soluções foram diluídas separadamente em fase móvel em balões volumétricos de 10 mL estabelecendo-se então uma concentração de 100 µg/mL de cada filtro solar. Para o preparo da solução padrão foram retiradas alíquotas de 0,4 mL, 0,75 mL e 0,5 mL das soluções de 100 µg/mL dos filtros 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila, respectivamente, e diluídas no mesmo balão volumétrico de 10 mL em fase móvel. Após as diluições, as concentrações

finais de 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila na solução padrão foram 4 µg/mL, 7,5 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente.

3.4. Validação da metodologia de CLAE

3.4.1. Seletividade

A seletividade do método é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto e produzir resultados confiáveis na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 1996). Para a avaliação da seletividade foram consideradas interferências dos componentes presentes nas formulações e nas peles de porco e camundongos na quantificação dos filtros solares.

3.4.2. Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da curva de calibração, utilizando-se cinco concentrações diferentes dos três filtros solares: 2,5 µg/mL; 4 µg/mL; 5 µg/mL; 7,5 µg/mL e 15 µg/mL; sendo que as análises foram feitas em triplicata para cada concentração (BRASIL, 2003). A curva de calibração foi construída plotando-se a concentração dos padrões versus a área dos picos.

3.4.3. Precisão

A precisão foi determinada em estudos intra e inter-ensaios para cada formulação em estudo (creme, loção e gel creme). Foram utilizadas as concentrações de 4 µg/mL; 7,5 µg/mL e 5 µg/mL para a 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila, respectivamente em fase móvel.

Amostras de 0,05 g das formulações foram diluídas em 50 mL de etanol. O processo de extração foi feito por ultrassonicação em temperatura ambiente durante 15 minutos. Alíquotas de 1 mL dessas soluções foram diluídas com a fase móvel em um balão volumétrico de 10 mL. As amostras preparadas foram filtradas em filtro tipo Millex® de 0,45 µm para análise em CLAE. Para a verificação do teor dos filtros solares nas formulações foi utilizada padronização externa com padrões dos filtros

solares 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila nas concentrações de 4 µg/mL; 7,5 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente.

Na avaliação intra-ensaio, as amostras foram analisadas em um mesmo dia e a precisão foi verificada por 6 determinações a 100% da concentração do teste. Na avaliação inter-ensaio, a determinação foi feita em dois dias diferentes e a precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 5%. A precisão do método foi expressa matematicamente e calculada pela seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$DPR (\%) = (\text{desvio padrão} / \text{concentração média}) \times 100$$

3.4.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método e foi verificada a partir de 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, com três concentrações baixa (80%), média (100%) e alta (120%) com três réplicas cada (BRASIL, 2003). Foram feitas três injeções de cada réplica.

Amostras de formulações contendo os filtros solares foram diluídas em etanol. O processo de extração foi feito por ultrassonicação em temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram preparadas diluições das formulações com baixa concentração (80%), média concentração (100%) e alta concentração (120%) dos filtros solares. As amostras preparadas foram filtradas em filtro tipo Millex® de 0,45 µm e injetadas em cromatógrafo líquido. Para a verificação do teor dos filtros solares foi utilizada padronização externa com padrões dos filtros solares 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila nas concentrações de 4 µg/mL, 5 µg/mL e 7,5 µg/mL, respectivamente.

A exatidão foi calculada pela seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão}(\%) = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

3.5. Estudos de penetração cutânea *in vitro*

3.5.1. Avaliação da recuperação dos filtros solares extraídos de amostras de pele

A avaliação da recuperação do processo de extração foi realizada adicionando-se quantidades conhecidas dos filtros solares na pele de orelha de porco e verificando se o processo de extração foi capaz de recuperar as quantidades adicionadas.

Foram adicionadas alíquotas de 100 µl de solução metanólica contendo concentrações conhecidas de cada filtro solar a secções de pele de orelha de porco de 1,77 cm². As peles foram previamente submetidas à técnica de *tape stripping* para a retirada do estrato córneo, e após a adição da solução metanólica foram mantidas em repouso por aproximadamente 30 minutos até que todo o metanol evaporasse. As soluções metanólicas contendo os filtros solares foram preparadas para que 100 µl dessas soluções contivessem 0,5%; 0,1% e 0,02% das quantidades dos filtros solares presentes em 300 mg de formulação. Essa avaliação da recuperação foi feita utilizando-se os três níveis de concentração, baixo (0,02%), médio (0,1%) e alto (0,5%) e para cada nível de concentração foram utilizadas três secções de pele de orelha de porco. Amostras de pele adicionadas somente com o metanol foram processadas utilizando-se o mesmo método de extração, com o objetivo de avaliar se os constituintes da pele poderiam interferir no processo de avaliação da retenção cutânea.

As peles foram picotadas, transferidas para tubo falcon contendo 2,5 mL de metanol e deixadas em banho de ultra-som por 30 minutos. Após a sonicação foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 5 mL e adicionou-se mais 2,5 mL de metanol ao tubo contendo a pele picotada repetindo-se o procedimento de extração. Assim, após nova extração, o sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico de 5 mL que teve seu volume completado com metanol. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm. A concentração dos filtros solares foi determinada por CLAE utilizando-se o procedimento analítico descrito anteriormente.

A recuperação do método foi calculada pela seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

Onde, C_e = concentração experimental dos filtros solares encontrada nas amostras após extração e C_t = concentração teórica inicial, adicionada à pele antes do processo de extração.

3.5.2. Estudo de retenção cutânea *in vitro*

Os experimentos de retenção cutânea foram conduzidos utilizando pele de orelha de porco, obtidas em abatedouro logo após o abate do animal (Fribom, Pontal-SP). As orelhas foram lavadas com água corrente e a pele da porção externa da orelha foi cuidadosamente removida com a ajuda de bisturi. Vasos sanguíneos, gordura e pêlos foram removidos, sendo que somente o estrato córneo, a derme e a epiderme foram isoladas. As peles de orelha de porco foram armazenadas a -20°C até o ensaio, por um período máximo de 30 dias.

Os estudos de penetração foram conduzidos utilizando-se células de Franz com compartimento de solução receptora com capacidade para 12 mL e área de difusão de $1,77\text{ cm}^2$. O meio receptor consistiu de um tampão fosfato 150 mM (pH 7,2) com 0,5% de polissorbato 20 (Tween 20[®]) para aumentar a solubilidade dos filtros solares e mantido a 37°C sob constante agitação de 500 rpm em barra magnética.

A pele de orelha de porco foi colocada na parte superior da célula receptora, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor da célula de difusão (Figura 1). Todo o cuidado foi tomado para se evitar a formação de bolhas de ar entre a pele e a solução receptora. Foi colocada sobre a pele 300 mg de formulação, sendo esta contendo os filtros solares ou não. As células foram protegidas da luz com papel alumínio.

Figura 1: Célula de difusão tipo "Franz".

Ao final de 6 horas, as peles de orelha de porco foram retiradas e limpas com algodões umedecidos com água destilada. A camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirada pressionando-se uniformemente 15 fitas adesivas tipo "durex" (*tape stripping*). As fitas foram descartadas. A pele remanescente (epiderme viável + derme) foi pesada, picotada e transferida para tubos contendo 2,5 mL de metanol. Em seguida a pele foi levada ao ultra-som por 30 minutos, agitada em vórtex por 1 minuto e posteriormente centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. Ao precipitado remanescente no tubo foram adicionados novamente 2,5 mL de metanol e levado ao ultra-som por 30 minutos, agitado em vórtex por 1 minuto e posteriormente centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante obtido foi recolhido e adicionado ao sobrenadante proveniente do primeiro processo de extração no balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão foi completado com metanol. As amostras obtidas foram filtradas em membranas com poros de 0,45 μm e a concentração dos filtros solares foi determinada por CLAE utilizando-se o procedimento analítico descrito anteriormente.

3.6. Estudo de retenção cutânea *in vivo*

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando camundongos sem pêlos da linhagem HRS/J, machos ou fêmeas, com três meses de idade. Os animais, pesando aproximadamente 30 g, foram criados no biotério da FCFRP-USP mantidos a 20-25°C, com livre acesso de água e comida, 4 trocas de ar/hora e ciclos claro/escuro de 12 h. Os experimentos foram conduzidos com aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – campus de Ribeirão Preto (Protocolo n° 08.1.1399.53.4).

Os experimentos foram realizados utilizando dois grupos de animais: grupo com formulação gel creme adicionada dos filtros solares e um grupo com a formulação gel creme placebo. Foi aplicada em uma área no dorso de 1,77 cm² uma quantidade de 10 mg de formulação. A área de aplicação foi delimitada utilizando-se um curativo adesivo (BandAid®, Johnson & Johnson) do qual foi retirado uma área circular de 1,77 cm² para delimitar a área de aplicação da formulação (Figura 2).

Figura 2: Estudo de retenção cutânea *in vivo*

Após 1 hora da aplicação das formulações os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e as áreas de pele na qual foram aplicadas as formulações foram removidas.

As peles foram picotadas para a realização do processo de extração utilizando metanol conforme realizado no estudo de retenção *in vitro*, e as

concentrações dos filtros solares foram determinadas por CLAE utilizando-se o procedimento analítico já descrito.

3.7. Avaliação da segurança *in vivo* dos filtros solares em formulação fotoprotetora

3.7.1. Irradiação dos camundongos sem pêlos

A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada ultravioleta fluorescente modelo PHILIPS TL40W/12 RS (Medical Holand), que emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. Esta fonte de luz UV foi instalada em um compartimento de madeira desenvolvido para os experimentos de indução do estresse oxidativo, como descrito por Casagrande, (2005). Das 6 repartições presentes no compartimento foram utilizadas somente as 4 centrais para serem colocadas as caixas plásticas com diferentes grupos de animais, a fim de evitar a variação de radiação observada nas repartições laterais. Os animais movimentaram-se livremente na caixa e suas regiões dorsais ficaram diretamente expostas a RUV, de maneira que os mesmos não poderiam se esconder. A parte superior das caixas foi coberta com uma tela plástica para manter os animais dentro das mesmas durante todo o tempo de exposição à radiação (Figura 3).

Figura 3: Caixa de irradiação utilizada para a exposição dos animais à radiação UVB (VICENTINI, 2009).

Os camundongos foram divididos em seis grupos: controle não irradiado (CNI), controle irradiado (CI), tratado com a formulação contendo os filtros solares e irradiado (IF), tratado com a formulação contendo os filtros solares e não irradiado (NIF), tratado com a formulação placebo e irradiado (IP) e tratado com a formulação placebo e não irradiado (NIP).

O protocolo de tratamento consistiu na aplicação tópica de 0,03 g de formulação no dorso dos animais 1 hora antes do início da irradiação.

Os grupos expostos à radiação foram colocados em compartimento de madeira contendo a lâmpada e expostos à radiação durante 3 horas, que corresponde à dose de 2,87 J/cm². Essa dose de radiação foi reportada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos – FCFRP-USP por Casagrande e colaboradores (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) como sendo uma dose a qual induz a depleção de GSH e indução da secreção/liberação de metaloproteínases. Baseando-se nesses trabalhos foi selecionada a dose de radiação para o presente trabalho.

Após 6 horas do término da irradiação, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e a morte foi comprovada pela ausência de batimentos cardíacos. As peles do dorso dos animais foram removidas, lavadas com solução de NaCl 0,9% e congeladas em nitrogênio líquido. As carcaças foram enviadas ao biotério central para incineração. Todo o procedimento acima descrito foi conduzido nas instalações do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

3.7.2. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

A glutathiona (GSH) é um dos antioxidantes endógenos mais importantes contra EROs induzidas por UV, dessa forma o monitoramento de suas quantidades pode ser utilizado para avaliação do estresse oxidativo (CARINI et al., 2000).

Os níveis de GSH na pele do dorso dos animais foram determinados utilizando o ensaio de fluorescência previamente descrito por Hissin e Hilf (1976). As amostras de pele foram retiradas do congelamento, picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, contendo EGTA 5 mM. Posteriormente, foram homogeneizadas em Turrax TE-102 (Turratec, São Paulo) durante 2 minutos a 21500 rpm. Para cada mililitro de tampão adicionado foram adicionados às amostras após a homogeneização 200 µL de ácido tricloroacético 30 %. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf e novamente centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C obtendo-se a fração sobrenadante (CASAGRANDE et al., 2006).

Na determinação das quantidades de GSH, 100 µL da fração sobrenadante foram adicionados a 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0), contendo EGTA 5 mM,

seguido da adição de 100 µL de o-ftalaldeído (OPT) 1 mg/mL preparado em metanol. A fluorescência foi determinada após 15 min em 350 e 420 nm, para excitação e emissão, respectivamente, em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 (HISSIN; HILF, 1976). A fluorescência obtida foi utilizada para o cálculo das quantidades de GSH presentes nas amostras de pele, empregando-se a equação de regressão linear da curva analítica obtida plotando-se concentrações conhecidas de GSH padrão (Sigma®) (µM) versus unidades de fluorescência.

3.7.3. Análise qualitativa da atividade das metaloproteinases

Foi utilizada SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) para a detecção de enzimas com atividade gelatinolítica (GERLACH et al., 2007; ONOUE et al., 2003).

Após o tratamento dos animais, as amostras de pele foram avaliadas qualitativamente quanto à atividade das metaloproteinases. As amostras de pele previamente tratadas, coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido, foram picotadas e diluídas 1:4 em tampão Tris/HCl (50 mM), contendo CaCl₂ (10 mM) pH 7,4, adicionado de 1% de mistura de inibidor de proteinases (Sigma®). As amostras foram homogeneizadas, com auxílio de Turrax a 21500 rpm por 2 minutos e deixadas durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, estas amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C sendo a fração sobrenadante retirada e novamente centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C (CASAGRANDE et al., 2005; VICENTINI et al., 2008). A 50 µL do sobrenadante das amostras foram adicionados 10 µL de tampão não redutor Tris/HCl (0,1 M), com SDS (4%), glicerol (20%) e azul de bromofenol (0,001%). Foram aplicados 10 µL desta mistura na placa de eletroforese.

Na montagem da placa de gel para eletroforese utilizou-se gel de concentração e de gel de separação a 10% (10 cm). Segue abaixo a composição dos géis:

Gel de separação

Água milli Q	5,87 mL
Tris/HCl (1,5 M) com SDS (0,4%) pH 8,8	3,75 mL

Acrilamida (30%): bis acrilamida (0,8%)	5 mL
Gelatina (10%)	375 µL
Persulfato de amônio 10%	50 µL
Temed	10 µL

Gel de concentração

Água milli Q	4,06 mL
Tris/HCl (0,5 M) com SDS (0,4%) pH 6,8	1,67 mL
Acrilamida (30%): bis acrilamida (0,8%)	860 µL
Persulfato de amônio 10%	33 µL
Temed	6,6 µL

O tampão usado nas cubas foi Tris/glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS (LAEMMLI, 1970). O gel foi submetido a uma pré-corrida de 15 minutos a 13 mA e então foi aplicada 40 µL de amostra corada. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi de 13 mA no gel de concentração e 16 mA no gel de separação, a corrente foi mantida constante até 15 minutos após a saída do corante do gel de separação.

Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi lavado por 1 hora com solução de Triton X-100 2% sob constante agitação e posteriormente incubado por 12 horas a 37°C em tampão de reação constituído de 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, CaCl₂ 10 mM e 0,02% de azida sódica (DEMACQ et al., 2008). Após incubação do gel no tampão de reação, este foi colocado por 10 minutos na solução corante contendo 0,1% de Coomassie Blue R 350, obtida pela diluição 1:2 da solução estoque do corante em solução de ácido acético 20%. A atividade proteolítica foi observada após descoloração do gel com solução de ácido acético 20%. O método de Lowry foi utilizado para dosagem de proteínas das amostras de pele (LOWRY et al., 1951).

3.7.4. Avaliação da eficácia antiinflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase

Após o tratamento dos animais, os camundongos foram sacrificados, como descrito anteriormente, e amostras da pele do dorso dos animais foram coletadas e armazenadas a – 80°C em microtubos contendo tampão K₂HPO₄ 50 mM adicionado

de 0,5% HTAB (Brometo de hexadecil trimetil-amônio), pH 6,0. Posteriormente, as amostras foram diluídas no mesmo tampão (100 mg/mL), homogeneizadas em Turrax a 21500 rpm por 2 minutos e centrifugadas a 12880 x g por 6 minutos a 4°C. A fração sobrenadante obtida foi analisada quanto à atividade de mieloperoxidase. Para isso, em placas de 96 poços, 30 µL das amostras foram adicionadas de 200 µL de tampão K₂HPO₄ (50 mM, pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada após 10 minutos do início da reação em comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se espectrofotômetro para placa de 96 poços. A atividade da enzima nas amostras foi determinada utilizando-se uma curva padrão de mieloperoxidase (Sigma, St Louis, MO). Os resultados foram expressos em unidades de mieloperoxidase por mg de pele (BRADLEY, 1982; CASAGRANDE et al., 2006).

3.7.5. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo*

As atividades da SOD na pele foram determinadas espectrofotometricamente de acordo com o método de redução do citocromo C descrito por McCord e Fridovich (1969). As amostras de pele foram retiradas do congelamento, picotadas, pesadas e diluídas 1:3 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. Posteriormente, as peles foram homogeneizadas em turrax durante 2 minutos a 21500 rpm. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo eppendorf e novamente centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C obtendo-se a fração sobrenadante. A fração sobrenadante foi diluída 10 vezes no tampão fosfato antes de iniciar a reação.

Foi adicionada em uma cubeta, 2,9 mL de uma solução composta por 0,76 mg (5µmol) de xantina, 10 mL de NaOH 1 mM, 24,8 mg (2µmol) de citocromo C e 100 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,8 com 0,1 mM de EDTA. A essa solução foram adicionados 50 µL de tampão fosfato, SOD-padrão ou amostra (homogeneizado de pele) e a reação foi iniciada pela adição de 50 µL de solução de xantina oxidase com aproximadamente 0,2 U/mL, obtida, extemporaneamente, pela diluição em 0,1 mM de EDTA. A reação foi monitorada por espectrofotometria a 550 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de SOD suficiente para inibir a taxa de redução do citocromo c em 50%, e a atividade da enzima foi expressa em unidades/mg de proteína.

3.8. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad® (versão 3.02, 1999). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão relativo (EPM) ou $\pm$ desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química das formulações

As formulações apresentaram-se aparentemente homogêneas, com coloração branca, odor característico e aspecto brilhoso durante todo o período de armazenamento.

4.1.1. Centrifugação

As formulações creme, loção e gel creme adicionadas ou não dos filtros solares após 7 dias da manipulação mantiveram-se estáveis frente ao teste de centrifugação sem separações de fases. A força da gravidade atua sobre a amostra fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras (BRASIL, 2004).

4.1.2. Determinação do pH

Foi observado um pequeno aumento do pH após adição dos filtros solares (Tabela 1). No entanto, os valores de pH das formulações foram considerados compatíveis com o pH da pele, uma vez que a pele apresenta pH entre 4,6 - 5,8 (LEONARDI; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2002).

Tabela 1: Medida do pH das formulações armazenadas a 4° C após 7 dias a partir da manipulação.

Formulações	pH
Creme (placebo)	6,60 ± 0,09
Creme (adicionado dos filtros solares)	6,67 ± 0,17
Loção (placebo)	6,42 ± 0,24
Loção (adicionado dos filtros solares)	6,52 ± 0,09
Gel creme (placebo)	5,75 ± 0,20
Gel creme (adicionado dos filtros solares)	5,76 ± 0,17

Os resultados representam a média de três determinações ± DPR.

4.2. Metodologia analítica para quantificação dos filtros solares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os filtros solares são facilmente determinados por cromatografia líquida em combinação com diferentes tipos de fases estacionárias e com uma grande variedade de fases móveis. Têm sido utilizadas eluições isocráticas, preparadas com somente um solvente ou uma mistura constante de solventes, e eluições por gradiente, com variação contínua da composição do solvente, ideais para misturas mais complexas contendo compostos de diferentes polaridades (BRASIL, 2008).

Frequentemente, os métodos são apropriados para determinar de quatro a seis filtros UV simultaneamente, no entanto, devido à estrutura similar de alguns filtros solares, a separação dos picos é dificultada mesmo quando são utilizadas eluições por gradiente (BRASIL, 2008).

A técnica de CLAE empregada mostrou-se adequada para a análise simultânea dos filtros solares 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila em amostras de formulações, pele de porco e pele de camundongo. O emprego da coluna C18 e fase móvel constituída de metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1%, na vazão de 1,0 ml/min, utilizando-se a detecção no comprimento de onda de 305 nm, permitiu uma boa definição e separação entre os picos. O tempo de análise foi relativamente baixo, de aproximadamente 20 minutos. Os tempos de eluição da 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila foram aproximadamente 6, 17 e 19 minutos, respectivamente (Figura 4). É possível reduzir o tempo da análise aumentando-se a proporção de metanol na fase móvel, no entanto, como seriam analisadas amostras compostas de peles de porco e camundongo, constituídas por muitas substâncias apolares, foi necessário aumentar o tempo de eluição do primeiro pico para que não houvesse interferência dos componentes da pele nas análises.

Figura 4: Cromatograma obtido a partir da injeção da solução padrão dos filtros solares (A) 3-BZ (4 $\mu\text{g/mL}$); (B) OMC (7,5 $\mu\text{g/mL}$) e (C) OS (5 $\mu\text{g/mL}$).

4.3. Validação da metodologia de CLAE

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação. As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas na literatura especializada como: seletividade, ajuste da curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 1996; RIBEIRO et al., 2008).

4.3.1. Seletividade

O método proposto permitiu a separação e quantificação dos filtros solares presentes nas formulações fotoprotetoras, na pele de orelha de porco e de camundongos sem pêlos. Os resultados obtidos nas análises das amostras de pele de orelha de porco após o teste de retenção cutânea mostraram que os excipientes das formulações e os componentes da pele de orelha de porco não interferiram nas análises. Houve uma pequena interferência dos componentes da pele de camundongo na quantificação do filtro solar salicilato de octila, no entanto, essa interferência não impossibilitou a avaliação da retenção cutânea *in vivo* desse filtro solar.

4.3.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A curva de calibração foi construída plotando-se a concentração dos padrões versus a área dos picos. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$ (BRASIL, 2003). O método mostrou-se linear na faixa de concentração estudada de 2,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ e as equações das retas foram $y = 41490x - 13080$ para 3-BZ, $y = 60800x + 11150$ para OMC e $y = 15350x - 3130$ para OS. Os valores dos coeficientes de correlação para todos os filtros solares apresentaram-se acima de 0,999.

4.3.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão inter-corridas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)(BRASIL, 2003). A precisão do método foi determinada em estudos intra e inter-ensaios para cada formulação em estudo (creme, loção e gel creme) estabelecida através da repetibilidade dos resultados, expressas pelo desvio padrão

relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

Os coeficientes de variação encontrados na avaliação da repetibilidade apresentam-se dentro da faixa de 1,69 a 2,66%. Na avaliação da precisão intermediária, os coeficientes de variação apresentam-se em uma faixa de 2,16 a 4,23% (Tabela 2). Os resultados demonstraram que o método analítico possui precisão satisfatória dentro da faixa de concentração avaliada.

Tabela 2: Avaliação da precisão, repetibilidade (n=6) e precisão intermediária (n=12), das análises quantitativas dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS por CLAE.

Formulação	Filtro solar	Concentração (µg/ml)	Repetibilidade DPR (%)	Precisão intermediária DPR (%)
Creme	3-Benzofenona	4,0	2,55	3,15
	Octilmetoxicinamato	7,5	2,31	2,39
	Salicilato de octila	5,0	1,69	2,16
Loção	3-Benzofenona	4,0	2,31	4,23
	Octilmetoxicinamato	7,5	2,61	3,51
	Salicilato de octila	5,0	2,66	3,28
Gel creme	3-Benzofenona	4,0	2,44	2,92
	Octilmetoxicinamato	7,5	1,88	3,53
	Salicilato de octila	5,0	2,47	3,03

Condições cromatográficas: coluna Supelcosil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), acoplada a pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck); fase móvel: metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1%; vazão: 1 mL/min; λ: 305 nm.

4.3.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo e foi verificada a partir de 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, com três concentrações baixa (80%), média (100%) e alta (120%) com três réplicas cada (BRASIL, 2003).

Para aplicações farmacêuticas, a porcentagem de recuperação do método deve estar compreendida entre 98 a 102% para garantir que o método seja exato (GREEN, 1996). O grau de recuperação dos filtros solares variou de 88,3 a 101,1 % para a formulação creme, 87,1 a 106,2 % para a formulação loção e 87,3 a 100,1 % para a formulação gel creme (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3: Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação creme utilizando a metodologia de CLAE.

FORMULAÇÃO: CREME	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%)	DPR (%)
3-Benzofenona	3,248	3,098	95,4	1,0
	4,060	3,945	97,2	0,8
	4,872	4,734	97,2	1,4
Octilmetoxicinamato	6,087	6,107	100,3	1,8
	7,609	7,660	100,7	0,2
	9,131	9,228	101,1	2,2
Salicilato de octila	4,123	3,640	88,3	1,1
	5,153	4,641	90,1	0,9
	6,184	5,591	90,4	1,3

Condições cromatográficas: coluna Supelcosil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), acoplada a pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck); fase móvel: metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1%; vazão: 1 mL/min; λ: 305 nm.

Tabela 4: Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação loção utilizando a metodologia de CLAE.

FORMULAÇÃO: LOÇÃO	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%)	DPR (%)
3-Benzofenona	3,242	3,061	94,4	0,2
	4,052	3,750	92,6	0,8
	4,862	4,540	93,4	1,0
Octilmetoxicinamato	6,085	6,464	106,2	1,4
	7,606	7,815	102,7	0,7
	9,127	9,441	103,4	1,2
Salicilato de octila	4,092	3,617	88,4	0,4
	5,115	4,678	87,1	0,3
	6,137	5,396	87,9	1,0

Condições cromatográficas: coluna Supelcosil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), acoplada a pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck); fase móvel: metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1%; vazão: 1 mL/min; λ: 305 nm.

Tabela 5: Determinação da exatidão da quantificação dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados a formulação gel creme utilizando a metodologia de CLAE.

FORMULAÇÃO: GEL CREME	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%)	DPR (%)
3-Benzofenona	3,224	3,032	94,1	3,9
	4,03	3,794	94,1	0,4
	4,836	4,519	93,4	1,2
Octilmetoxicinamato	6,035	6,042	100,1	3,5
	7,544	7,481	99,2	1,1
	9,053	8,963	99,0	0,5
Salicilato de octila	4,119	3,824	92,8	4,1
	5,148	4,525	87,9	0,2
	6,178	5,391	87,3	1,2

Condições cromatográficas: coluna Supelcosil™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), acoplada a pré-coluna C-18 (4 x 4 mm, Merck); fase móvel: metanol:água (84:16 v/v) acidificada com ácido acético glacial 0,1%; vazão: 1 mL/min; λ: 305 nm.

Embora os valores encontrados não se encontrem na faixa do limite permitido, por se tratar de uma preparação cosmética, e devido à complexidade na determinação de ativos em cosméticos, estes resultados foram considerados satisfatórios (SCHAKEL; KALSBECK; BOER, 2004).

4.4. Estudos de penetração cutânea *in vitro*

4.4.1. Avaliação da recuperação dos filtros solares extraídos de amostras de pele

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse, isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI et al., 2004).

O grau de recuperação dos filtros solares foi em média de 75,41 % para a 3-benzofenona, 92,35 % para o octilmetoxicinamato e 81,33 % para o salicilato de

octila. É desejável que o DPR não seja superior a 5%, no entanto, este variou de 2 a 8,05% (Tabela 6).

Tabela 6: Determinação da recuperação do processo de extração dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS adicionados em pele de orelha de porco.

FILTRO SOLAR	Quantidade adicionada (µg)	Quantidade encontrada (µg)	Recuperação (%)	DPR (%)
3-Benzofenona	2,4	1,76	73,32	2,0
	12,0	9,51	79,2	4,12
	60,0	44,26	73,72	4,52
Octilmetoxicinamato	4,5	4,08	90,69	2,72
	22,5	19,59	87,04	3,40
	112,5	111,82	99,33	5,21
Salicilato de octila	3,0	2,95	98,41	8,05
	15,0	11,22	74,77	4,89
	75,0	53,15	70,81	3,05

Por se tratar de compostos lipofílicos, com grande afinidade pelos componentes da pele e à complexidade da amostra, os resultados podem ser considerados satisfatórios para o presente estudo.

4.4.2. Estudo de retenção cutânea *in vitro*

Comparando-se os perfis cromatográficos das amostras do estudo de retenção das formulações contendo ou não os filtros solares, foi possível observar que os componentes das formulações e da pele de orelha de porco não interferiram nas análises. Além disso, ocorreu retenção de todos os filtros solares na epiderme viável quando foram utilizadas as formulações gel creme, creme e loção (Figuras 5 e 6).

Figura 5: Cromatogramas correspondentes às retenções dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS em pele de orelha de porco veiculados nas formulações gel creme (A), creme (B) e loção (C).

Figura 6: Cromatogramas correspondentes às retenções em pele de orelha de porco das formulações gel creme (A), creme (B) e loção (C) sem adição dos filtros solares.

Tabela 7: Quantidades dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS retidas em pele de orelha de porco.

	Gel creme		Crema		Loção	
	Retenção ^a	Retenção ^b	Retenção ^a	Retenção ^b	Retenção ^a	Retenção ^b
3-BZ	27,75 ± 5,97	0,41 ± 0,09	14,84 ± 1,76	0,22 ± 0,03	15,83 ± 1,73	0,23 ± 0,02
OMC	32,70 ± 9,91	0,26 ± 0,07	11,40 ± 3,36	0,09 ± 0,02	8,93 ± 3,96	0,07 ± 0,03
OS	18,33 ± 5,85	0,22 ± 0,06	7,24 ± 1,86	0,08 ± 0,02	5,70 ± 1,95	0,07 ± 0,02

^a Quantidade dos filtros solares retida na pele por área de pele (1,77 cm²) sem estrato córneo após 6 horas expressa em µg/cm².

^b Quantidade dos filtros solares retida na pele por área de pele (1,77 cm²) sem estrato córneo após 6 horas expressa em % da dose aplicada.

Os resultados representam a média (n=6) ± DP (desvio padrão).

* A análise estatística foi feita usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Dados com p<0,05 foram considerados significantes.

A formulação gel creme propiciou a maior retenção dos filtros solares na epiderme + derme ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas retenções dos filtros solares quando veiculados no creme e na loção. A retenção do filtro solar 3-benzofenona foi aproximadamente 1,9 e 1,8 vezes maior na formulação gel creme quando comparada ao creme e à loção, respectivamente. A retenção do octilmetoxicinamato foi aproximadamente 2,86 vezes maior na formulação gel creme em comparação a formulação creme e 3,66 vezes maior que na loção. O filtro solar salicilato de octila ficou 2,53 e 3,22 vezes mais retido na pele quando veiculado na formulação gel creme em comparação com as formulações creme e loção, respectivamente (Tabela 7).

Sugere-se que a diferença significativa entre os valores de retenções dos filtros solares quando veiculados no gel creme em comparação com as demais formulações deve-se principalmente à afinidade dos filtros solares pelos veículos. As formulações creme e loção apresentam um conteúdo graxo maior que o gel creme, e por isso a quantidade dos filtros solares disponíveis para a penetração cutânea pode ser diminuída, pois esses filtros apresentam um caráter altamente lipofílico e tendem a ficar mais retidos nas formulações creme e loção.

Comparando-se as quantidades retidas de cada filtro solar na mesma formulação expressas em porcentagem da dose aplicada, conclui-se que a 3-benzofenona apresentou maior capacidade de retenção. Essa diferença de retenção da 3-benzofenona quando comparada ao octilmetoxicinamato e o salicilato de octila foi aproximadamente 1,7; 2,6 e 3,3 vezes maior nas formulações gel creme, creme e loção, respectivamente. Sugere-se que este fato possa ser explicado considerando-se as características físicas e químicas de cada molécula, e consequentemente, a habilidade de penetrar o estrato córneo e atingir as camadas mais profundas da pele.

A 3-benzofenona é um filtro solar caracterizado por pequena massa molecular (228,5 g) e um log P de 3,58 calculado por Treffel e Gabard (1996), propriedades que sugerem que esse agente fotoprotetor possua uma boa capacidade de penetração cutânea (FERNANDEZ et al., 2002). Embora os filtros solares apresentem caráter altamente lipofílico, dentre eles, a 3-benzofenona possui o menor coeficiente de partição octanol/água. Por esse motivo pode ter atravessado mais facilmente a barreira lipídica do estrato córneo e ter sido o composto que mais se reteve na epiderme viável.

Os filtros solares octilmetoxicinamato e salicilato de octila possuem coeficiente de partição octanol/água $\log P = 5,96$ e $\log P = 6,02$, respectivamente (TREFFEL; GABARD, 1996). Devido ao fato de serem substâncias altamente lipossolúveis, possuem a capacidade de acumular-se e ficarem retidos nos lipídios que compõem o estrato córneo. Portanto, a penetração destes compostos orgânicos nas camadas mais profundas da pele é limitada, devido à natureza hidrofílica da epiderme viável que age como um fator limitante da penetração de substâncias muito lipossolúveis (WALTERS et al., 1997). Além disso, o estrato córneo tem se mostrado uma barreira lipofílica considerável à penetração de substâncias químicas (BARRY, 1983; DURAND et al., 2009).

Treffel e Gabard (1996) concluíram após estudos de penetração dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS em pele humana, conduzidos por 6 horas, que a formulação tipo gel creme promoveu uma maior retenção dos filtros solares na epiderme+derme em comparação à formulação do tipo pomada. A retenção na epiderme+derme foi de aproximadamente $5,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (4,42% da dose aplicada), $17,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (9,4% da dose aplicada) e $5,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (7,8% da dose aplicada) para a 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila, respectivamente quando veiculados na formulação gel creme.

Gupta e colaboradores (1999) observaram que a penetração dos filtros solares 3-benzofenona e octilmetoxicinamato na pele de porco e a retenção no estrato córneo são dependentes da formulação. Verificaram também que a penetração é maior quando os filtros solares são aplicados em combinação que quando aplicados isoladamente. Nesse estudo, os pesquisadores observaram uma maior penetração na pele da 3-benzofenona em comparação com o octilmetoxicinamato, e analisando-se a retenção no estrato córneo, o octilmetoxicinamato apresentou uma retenção maior do que a da 3-benzofenona.

A permeação e a retenção do agente fotoprotetor octilmetoxicinamato foi avaliada *in vitro* utilizando pele de porco por Jiménez et al (2004). Foram consideradas emulsões do tipo óleo/água e água/óleo contendo o octilmetoxicinamato (5%) livre ou encapsulado em nanocápsulas. O acúmulo na pele do filtro solar na forma livre veiculado nos dois tipos de emulsões foi maior que o encapsulado. A quantidade do filtro solar na forma livre retida na epiderme+derme em 3 horas foi de aproximadamente 1,7% da dose aplicada.

É conhecido que uma formulação fotoprotetora deve permanecer no estrato córneo e nas camadas mais externas da pele, sem que ocorra a penetração cutânea (KLINUBOL; ASAWANONDA; WANICHWECHARUNGRUANG, 2008). No entanto, neste trabalho, o objetivo dos estudos de retenção cutânea foi avaliar a retenção cutânea e selecionar a formulação capaz de promover a maior retenção dos filtros solares. A formulação gel creme foi selecionada para que fossem realizados os estudos posteriores de penetração *in vivo*, quantificação do sistema de antioxidante endógeno GSH, da enzima antioxidante superóxido dismutase e avaliação das atividades de metaloproteinases e mieloperoxidases na pele submetida à ação dos filtros solares exposta ou não à radiação UV.

4.5. Estudo de retenção cutânea *in vivo*

A pele de camundongos sem pêlos tem sido comumente utilizada nos estudos de penetração cutânea. A vantagem de se utilizar esses animais baseia-se principalmente no fato de ser animais de pequeno porte, fácil manuseio e de custo relativamente baixo. A ausência de pêlos mimetiza a pele humana e o fato de não ser necessária a remoção dos pêlos evita o risco de injúria ao tecido cutâneo (GODIN; TOUITOU, 2007).

Através de testes *in vivo* utilizando o organismo do animal como um todo, é possível observar a influência de outros parâmetros na absorção de ativos, tais como o metabolismo cutâneo e a presença de circulação sanguínea, que influenciam grandemente o transporte de ativos, principalmente os lipofílicos, até a derme (MOSER et al., 2001).

Figura 7: Cromatogramas correspondentes às retenções em pele de camundongo sem pêlo da formulação gel creme adicionada dos filtros solares 3-BZ, OMC e OS (A) e da formulação gel creme placebo (B).

Tabela 8: Quantidades dos filtros solares retidos em pele de camundongo sem pêlos.

Gel creme		
	Retenção ^a	Retenção ^b
3-BZ	17,91 ± 4,03	2,64 ± 0,59
OMC	29,04 ± 8,01	2,28 ± 0,63
OS	18,63 ± 5,59	1,46 ± 0,43

^a Quantidade dos filtros solares retida na pele por área de pele (1,77 cm²) sem estrato córneo após 1 hora da aplicação da formulação expressa em µg/cm².

^b Quantidade dos filtros solares retida na pele por área de pele (1,77 cm²) sem estrato córneo após 1 hora da aplicação da formulação expressa em % da dose aplicada.

Os resultados representam a média (n=6) ± DP (desvio padrão).

Com este estudo de retenção cutânea *in vivo*, foi possível garantir que após uma hora da aplicação da formulação, houve retenção dos filtros solares 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila na pele de camundongos sem pêlos (Tabela 8). O tempo de uma hora de penetração foi escolhido em função dos estudos de avaliação da segurança *in vivo* dos filtros solares, uma vez que a formulação é aplicada e após uma hora da aplicação os animais são submetidos a 3 horas de exposição à radiação.

Os componentes das formulações e da pele dos camundongos sem pêlos não interferiram na quantificação dos filtros solares 3-benzofenona e octilmetoxicinamato utilizando a metodologia de CLAE. No entanto, houve uma pequena interferência dos componentes da pele de camundongo na quantificação do filtro solar salicilato de octila. Ocorreu coincidência nos tempos de eluição desse filtro solar e de alguma substância presente na pele. Devido ao fato da área do pico cromatográfico dessa interferência ter sido pequeno em relação à área do pico do filtro solar, e ter sido reproduzível em todas as amostras, foi possível calcular a retenção do salicilato de octila subtraindo-se das áreas do pico do filtro solar a média das áreas dos picos do interferente. Portanto, os valores encontrados de retenção cutânea são valores que sugerem uma faixa de retenção (Figura 7). No entanto, qualitativamente foi possível comprovar a retenção do salicilato de octila e garantir que este esteja presente na epiderme viável após 1 hora da aplicação da formulação.

Os resultados do estudo de retenção *in vivo* são de grande importância para o presente estudo porque garantem a presença dos filtros solares na epiderme+derme no início da irradiação dos animais.

4.6. Avaliação da segurança *in vivo* dos filtros solares em formulação fotoprotetora

4.6.1. Quantificação do antioxidante endógeno GSH

Devido à capacidade de promover uma maior retenção dos filtros solares em pele de orelha de porco, a formulação gel creme adicionada dos filtros solares foi selecionada para o estudo de avaliação da eficácia fotoprotetora realizado através da quantificação da GSH na pele de camundongos expostos à radiação UVB.

Estudos realizados por Casagrande (2006) e Vicentini e colaboradores (2008) demonstraram que a radiação UVB induziu uma diminuição dose dependente (0,96 – 2,87 J/cm²) nos níveis de GSH na pele de camundongos. Houve diferença estatística em relação ao grupo controle não irradiado a partir da dose de 1,91 J/cm², sendo esta também estatisticamente diferente da dose final testada (2,87 J/cm²).

Os resultados do presente estudo mostram uma redução significativa de 31,30% de GSH em função da radiação UVB (2,87 J/cm²), quando comparados os grupos controle irradiado e controle não irradiado. Estes resultados corroboram com

Fuchs et al. (1989), que verificaram uma diminuição significativa imediata da GSH na pele de camundongos sem pêlos expostos a radiação UVB em comparação ao controle não irradiado, indicando que o sistema glutatona é fortemente alterado pelo estresse fotooxidativo (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da eficácia *in vivo* da formulação gel creme adicionada dos filtros solares pela recuperação dos níveis de GSH depletados. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, IF = irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e NIP = não irradiado e tratado com a formulação placebo. Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ EPM ($n=2-3$ animais por grupo). * $p<0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI) e ** $p<0,05$ diferença significativa comparado ao controle irradiado (CI), usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos controle não irradiado, e não irradiados tratados com a formulação placebo ou com a formulação adicionada dos filtros solares, indicando que os componentes das formulações, como também os três filtros solares não promoveram modificações nos níveis normais de GSH. A aplicação tópica da formulação gel creme adicionada dos filtros solares foi capaz de recuperar 76,62% de GSH depletada pela exposição à radiação UVB, e a administração da formulação placebo não foi capaz de proteger a GSH dos efeitos da radiação, sugerindo que a atividade da formulação adicionada dos filtros deve-se à presença desses agentes fotoprotetores (Figura 8).

O conteúdo de GSH é significativamente reduzido com a exposição à radiação UVB induzindo um aumento dos níveis de EROs (HO et al., 2005). A glutatona atua como sequestradora direta dos radicais livres pela transferência de hidrogênio. Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a

GSSG feita pela enzima glutathione redutase. Sob condições de excesso de agentes oxidantes haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG estabelecendo assim o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os filtros solares são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV (alta energia) e transformá-la em radiações menos energéticas e inofensivas ao ser humano protegendo a pele contra a formação de EROs (BONDA, 2008; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Sendo assim, o consumo de GSH para reduzir esses radicais oxidantes na pele protegida com o filtro solar será menor quando comparado a uma pele desprotegida.

Embora os filtros solares tenham se mostrado eficazes na proteção do antioxidante endógeno GSH, não houve uma recuperação de 100% da glutathione depletada. Em estudos realizados anteriormente no mesmo laboratório por Fonseca e colaboradores (2010), sob as mesmas condições de irradiação, a administração tópica de formulação contendo extrato concentrado de calêndula mostrou-se capaz de inibir a depleção dos níveis de GSH em 100%. O extrato concentrado de calêndula apresentou eficácia semelhante à quercetina, epigallocatequina-3-galato e aos polifenóis do chá verde como demonstrado por Casagrande e colaboradores (2006), Vicentini e colaboradores (2008) e Vayalil, Elmets e Katiyar (2003).

Portanto, apesar dos filtros solares terem oferecido uma proteção de 76,6% contra a depleção do GSH, verifica-se a necessidade de estudos que visem buscar novas moléculas fotoprotetoras, combinações de agentes fotoprotetores estáveis ou até mesmo a utilização de associações de filtros solares com substâncias antioxidantes para a obtenção de formulações fotoprotetoras capazes de proteger completamente a depleção do antioxidante endógeno GSH induzida pela radiação UVB na pele.

4.6.2. Análise qualitativa da atividade das metaloproteinases

O presente estudo avaliou de forma qualitativa, o efeito da aplicação tópica da formulação gel creme, adicionada dos filtros solares, na atividade/secreção de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular na pele de camundongos expostos à radiação UVB ($2,87 \text{ J/cm}^2$), empregando zimografia em gel de poli(acrilamida) com SDS. A identificação das metaloproteinases nas amostras foi

feita por comparação da mobilidade eletroforética da amostra e de padrões de massa molecular (PageRuler prestained protein ladder plus SM 1819, Fermenta®).

O resultado obtido neste estudo referente ao grupo controle irradiado corrobora com outros estudos desenvolvidos por Xu e Fisher (2005), que verificaram que as radiações ultravioleta UVA e UVB são indutoras da secreção e ação das gelatinases, principalmente da MMP-9.

A análise dos resultados obtidos sugere que na pele dos animais irradiados tratados com a formulação adicionada dos filtros solares não ocorreu alterações na atividade/secreção da metaloproteinase – 9 (MMP-9, 92 kDa) em comparação com o grupo irradiado, no qual foi percebido um aumento na atividade/secreção induzido pela radiação UVB. Comparando-se os grupos irradiado com a formulação adicionada dos filtros, e irradiado com a formulação placebo, percebe-se que não há diferença entre esses grupos e fica evidenciado que a presença dos filtros solares não foi capaz de promover alterações na atividade/secreção da MMP-9 (Figura 9). Conclui-se que os filtros solares 3-BZ, OMC e OS presentes na formulação em estudo, não são inibidores de metaloproteinases. Além disso, a formulação desenvolvida adicionada dos filtros solares nas concentrações em estudo não foi eficiente em impedir a penetração da radiação UVB na pele. Consequentemente, houve geração de radicais livres que induziram a síntese de metaloproteinases pelo mecanismo de sinalização celular.

Analisando-se os grupos não irradiado, não irradiado tratado com a formulação placebo e não irradiado tratado com a formulação adicionada dos filtros, é possível identificar a presença da MMP-9, porém em quantidades menores que as observadas nos grupos irradiados. A presença da MMP-9 em baixa quantidade nos grupos não irradiados deve-se ao fato de que essas enzimas são constitutivas, isto é, estão normalmente presentes na pele. No entanto, a expressão basal é relativamente baixa, sendo aumentada pela radiação tanto *in vivo* quanto em cultura de células (JENKINS, 2002).

Figura 9: Avaliação do efeito da formulação gel creme adicionada dos filtros solares na atividade/secreção de enzimas proteolíticas em gel de poliacrilamida com SDS/gelatina. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, IF = irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e NIP = não irradiado e tratado com a formulação placebo. Os resultados são representativos de 3 experimentos (n=2-3 animais por grupo).

O aumento na expressão das metaloproteinases tem sido observada em quase todas as doenças nas quais a inflamação está presente, e recentes estudos realizados com processos de doença humana *in vitro* e em ratos sugerem que as MMPs evoluíram para atuarem em ampla função de defesa, nas lesões, na inflamação e nos processos de reparo. Apesar do processo inflamatório ser essencial para a defesa do organismo e para os reparos dos tecidos, quando desregulado ou em excesso, pode contribuir para o aumento da lesão, disfunção em órgãos e doenças crônicas. As MMPs contribuem para o processo inflamatório modulando os mediadores da inflamação (MANICONE; MCGUIRE, 2008).

Além disso, as MMP-9 e MMP-2 possuem a capacidade de degradar o colágeno parcialmente degradado pelas collagenases. O acúmulo do colágeno parcialmente degradado tem um impacto negativo sobre os fibroblastos. Estudos *in vitro* mostraram que tanto a capacidade proliferativa dos fibroblastos quanto a síntese de colágeno são reduzidas quando as células são expostas ao colágeno degradado (VARANI, et al., 2001). Diversos trabalhos têm demonstrado a efetividade do tratamento tópico com antioxidantes na inibição do aumento da

expressão de MMPs induzido pela radiação UV (KANG et al., 2003; VAYALIL et al., 2004; VICENTINI et al., 2008).

A partir dos resultados obtidos verifica-se a necessidade de estudos sobre o efeito dos filtros solares na atividade/secreção das collagenases, principalmente da MMP-1, responsáveis pela degradação do colágeno intacto. Caso as moléculas de filtro solar induzam a degradação do colágeno, estaremos diante de uma situação perigosa para a saúde da pele. Caso não haja indução das collagenases devido ao uso dos filtros solares, o fato de os filtros solares não inibirem a atividade/secreção da MMP-9 na pele de camundongos irradiados poderá ser benéfica para a modulação do processo inflamatório instalado e para estimulação da síntese do novo colágeno.

4.6.3. Avaliação da eficácia antiinflamatória pela medida da atividade da mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima peróxido de hidrogênio oxidoredutase, é especificamente encontrada em leucócitos granulocíticos, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, basófilos e eosinófilos e contribui para capacidade bactericida destas células. A MPO tem sido usada como um biomarcador para avaliar a resposta inflamatória para um número bem caracterizado de irritantes da pele e promotores de tumor (TRUSH et al., 1994). O ensaio para dosagem da MPO seguiu o protocolo descrito por Bradley et al. (1982).

Estudos descrevem que a irradiação UVB induz um aumento dose dependente (0,61- 3,69 J/cm²) na atividade de MPO na pele de camundongos sem pêlos (CASAGRANDE et al., 2006). No presente estudo, a irradiação UVB (2,87 J/cm²) induziu um aumento de 41,22% na atividade de MPO comparado ao grupo controle sem irradiação.

A administração tópica da formulação gel creme contendo os filtros solares 3-BZ (4%), OMC (7,5%) e OS (5%) não foi capaz de inibir o processo inflamatório induzido pela radiação UVB. A atividade da enzima no grupo irradiado tratado com a formulação com os filtros solares foi muito próxima à atividade no grupo controle irradiado sem a formulação. Mais uma vez fica evidenciado que a formulação desenvolvida não foi eficiente no bloqueio da radiação UVB, possibilitando a geração

de radicais livres, responsáveis pela ativação dos mediadores do processo inflamatório, como a migração de neutrófilos para a área exposta.

Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre as atividades da MPO nos grupos tratado com a formulação com os filtros solares e não irradiado, tratado com a formulação placebo e não irradiado e controle não irradiado, o que indica que a presença dos filtros solares e dos componentes da formulação não foram capazes de alterar os níveis normais da MPO presente na pele (Figura 10).

Figura 10: Avaliação da eficácia in vivo da formulação gel creme adicionada dos filtros solares pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO). Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, IF = irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e NIP = não irradiado e tratado com a formulação placebo. Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ EPM ($n=3$ animais por grupo). * $p<0,05$ diferença significativa comparado ao controle não irradiado (CNI), usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Sugere-se que a não inibição do processo inflamatório pelo uso da formulação com os filtros solares tenha ocorrido devido ao fato dos filtros terem sofrido processos de degradação pela radiação UV e consequente perda ou diminuição do potencial fotoprotetor em associação com a formação de espécies reativas. Esse processo de dissociação dos filtros solares em fragmentos reativos após a exposição à radiação UV já foi demonstrado por diversos autores (DIAZ-CRUZ; LORCA; BARCELÓ, 2008).

4.6.4. Avaliação da atividade da superóxido dismutase *in vivo*

Os resultados apresentados demonstraram que o método utilizado foi adequado para a determinação da atividade da SOD nas amostras de pele, uma vez que os componentes da formulação e os filtros solares não interferiram na reação de determinação da atividade da SOD. Ao observarmos os grupos IP e NIP, fica evidente que os componentes da formulação não interferiram na atividade da enzima na pele até mesmo quando irradiados, uma vez que as atividades da SOD nesses grupos mantiveram-se semelhantes à do grupo CNI. Portanto, não houve interferência dos componentes da formulação placebo na atividade da SOD. Além disso, não houve interferência no método devido à presença dos filtros solares, uma vez que o grupo NIF também apresentou a atividade da SOD semelhante ao grupo controle não irradiado (Figura 11). Conclui-se então que a presença dos filtros solares no meio reacional não é capaz de inibir a superóxido dismutase ou até mesmo gerar espécies reativas.

Figura 11: Avaliação da atividade da SOD na pele de camundongos sem pêlos. Onde, CNI = controle não irradiado, CI = controle irradiado, IF = irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, NIF = não irradiado e tratado com a formulação contendo os filtros solares, IP = irradiado e tratado com a formulação placebo e NIP = não irradiado e tratado com a formulação placebo. Os resultados representam a média de 3 experimentos $\pm$ EPM ($n=2-3$ animais por grupo). * $p<0,05$ diferença significativa comparado aos demais grupos, usando ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Analisando os resultados, verificou-se que não houve diferença significativa nas atividades da SOD quando comparados os grupos CI e CNI após 6 horas da irradiação dos camundongos. Esse resultado corrobora com resultados obtidos por Pence e Naylor (1990), que demonstraram que a atividade da enzima sofreu um decréscimo significativo somente após 12 horas de uma única exposição de camundongos sem pêlos à radiação UVB e manteve-se suprimida por mais de 72 horas após essa exposição. Em estudos realizados por Miyachi e colaboradores (1987), a redução na atividade da SOD foi verificada somente após 24 e 48 horas da exposição dos camundongos à radiação UVB. Portanto, os resultados do presente estudo corroboram com os dados da literatura, isto é, após 6 horas da irradiação não houve diferença significativa entre os grupos CI e CNI.

Estudos sugerem que o decréscimo na atividade da SOD causado pela radiação UVB, geralmente observado entre 12 e 72 horas após a exposição, deve-se tanto ao aumento no consumo das enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pela radiação quanto a uma destruição nos centros ativos de cobre e ferro da enzima via reação de Fenton (CHEVION, 1988; PENCE; NAYLOR, 1990). Além disso, de acordo com a teoria do fotoenvelhecimento da pele, a geração de espécies reativas de oxigênio resulta na formação de cross-links protéicos no colágeno e em certas enzimas como a catalase e a superóxido dismutase (DALLE CARBONARE; PATHAK, 1992).

Embora não tenham sido observadas alterações na atividade da SOD nos grupos CI e CNI após 6 horas da exposição à radiação UVB, não foi necessário realizar mais medidas da atividade enzimática em tempos maiores devido ao fato de já ter sido percebido um decréscimo da atividade no grupo IF após as 6 horas da exposição à RUV. Mesmo no tempo em que a RUV, por si só, não foi suficiente para provocar alterações na enzima, foi observado decréscimo na atividade da SOD no grupo IF de 63,93% em relação ao grupo CI.

Embora estudos sugiram inativação da SOD pela ação da radiação UV, no presente estudo isso não foi percebido no tempo avaliado no grupo CI, o que descarta a possibilidade da diminuição na atividade da SOD no grupo IF ter sido resultante da inativação da enzima devido à RUV.

Diante desses resultados, foi levantada a hipótese de que a presença dos filtros solares na epiderme poderia estar aumentando a quantidade de radicais superóxido na pele ou até mesmo estarem ligando-se à SOD inativando-a.

Entretanto, ao observar os resultados do grupo NIF verificou-se que este grupo de animais apresentou o nível da SOD semelhante ao grupo controle não irradiado. Portanto, a diminuição da atividade enzimática no grupo IF não ocorreu unicamente pelo fato dos filtros solares terem penetrado na pele.

Portanto, conclui-se que a presença dos filtros solares e dos componentes da formulação na pele, e a exposição à radiação UVB não foram capazes de diminuir a atividade da SOD na pele quando presentes isoladamente, o que foi percebido nos grupos CI, IP, NIP e NIF. No entanto, quando foram associados no grupo IF a presença dos filtros solares na epiderme com a exposição à radiação UV, ocorreu um decréscimo significativo na atividade da enzima. Sugere-se então que os filtros solares possam ter sofrido processos de degradação pela radiação e que os produtos de degradação formados possam ter inibido a enzima, ou, além disso, ter gerado espécies reativas na pele conforme já descrito por alguns autores.

Tem crescido evidências de que os filtros solares podem não ser suficientemente seguros, principalmente devido à fotoinstabilidade de filtros solares orgânicos, uma vez que os mesmos, após a exposição à radiação UV, sofrem processos de fotólise que promovem a dissociação desses agentes em fragmentos reativos e de fotoisomerização, no qual os filtros solares perdem as propriedades de fotoproteção (DÍAZ-CRUZ; LLORCA; BARCELÓ, 2008).

E isso é ainda mais preocupante uma vez que as moléculas dos filtros solares penetram através da epiderme e esses produtos de degradação altamente reativos entram em contato direto com as estruturas da epiderme e derme (MAIER et al., 2001; SCHALLREUTER et al., 1996).

Diversos filtros solares, dentre eles a 3-benzofenona, o octilmetoxicinamato e o salicilato de octila, são capazes de penetrar através do estrato córneo e de gerar EROs na epiderme quando submetidos à radiação (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006).

Estudos demonstraram que o filtro solar octilmetoxicinamato, um dos mais utilizados no mundo, após a exposição à radiação UV, produziu produtos de degradação com maior toxicidade para células de ratos quando comparado ao mesmo filtro não irradiado (BUTT; CHRISTENSEN, 2000).

A inativação de enzimas pela 3-benzofenona após a irradiação já foi demonstrada. A 3-benzofenona é rapidamente oxidada pela radiação UV em sua semiquinona, um potente eletrófilo que reage com os grupos tióis, presentes na

tiorredoxina redutase e na glutatona reduzida, respectivamente. Apesar de ser um excelente filtro solar, a rápida oxidação e a consequente inativação de importantes sistemas antioxidantes indica que esse filtro solar possa ser prejudicial para a homeostasia da epiderme (SCHALLREUTER et al., 1996).

Os resultados obtidos são de grande importância para despertar a necessidade de mais estudos que avaliem o efeito concomitante dos filtros solares e da radiação UV *in vivo*, uma vez que grande parte dos estudos de fotoestabilidade dos filtros solares é realizada *in vitro* sem associação com os efeitos nas estruturas biológicas.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos *in vivo* conclui-se que a formulação adicionada dos filtros solares foi capaz de proteger parcialmente a depleção do antioxidante endógeno GSH induzida pela radiação ultravioleta. Esta proteção provavelmente deve-se ao fato dos filtros solares terem absorvido a radiação ultravioleta, diminuindo assim a penetração da radiação na pele e consequentemente evitando a formação de EROs devido à exposição a radiação. Com isso, a oxidação do antioxidante GSH foi reduzida em relação à oxidação na pele exposta à radiação sem proteção.

Com relação à atividade/secreção das metaloproteinases, verificou-se que a formulação fotoprotetora não foi capaz de causar alterações na atividade/secreção da metaloproteinase – 9 quando comparada a atividade/secreção no grupo irradiado, no qual foi percebido um aumento na atividade/secreção induzido pela radiação UVB. Conclui-se que os filtros solares 3-BZ, OMC e OS não são inibidores de metaloproteinase. Além disso, a formulação adicionada dos três filtros solares nas concentrações utilizadas neste estudo, não foi eficaz em impedir a penetração da radiação UVB na pele. Consequentemente, houve geração de radicais livres que induziram a síntese de metaloproteinases por mecanismos de sinalização celular.

O tratamento da pele com a formulação adicionada dos filtros solares não foi capaz de reduzir a atividade das mieloperoxidases, que é aumentada após a exposição da pele à radiação. Mais uma vez fica evidenciado que a formulação desenvolvida não foi eficiente no bloqueio da radiação UVB, possibilitando a geração de radicais livres responsáveis pela ativação dos mediadores do processo inflamatório, como a migração de neutrófilos para a área exposta.

Finalmente, a análise dos resultados permite concluir que os filtros solares não são capazes de inibir a superóxido dismutase. No tempo de 6 horas após a exposição à radiação UVB, não foi observada redução na atividade da SOD devido à radiação. No entanto, quando foram associados a presença dos filtros solares na epiderme com a exposição à radiação UV, ocorreu um decréscimo significativo na atividade da enzima. Sugere-se então que os filtros solares possam ter sofrido processos de degradação pela radiação e que esses produtos formados possam ter inibido a enzima, ou até mesmo ter gerado espécies reativas na pele.

6. REFERÊNCIAS

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 63, p. 61-69, 2001.

ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; ROSSI, C.; RICCI, M.; RASTRELLI, A.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; LA ROSA, C. New microencapsulated sunscreens: technology and comparative evaluation. **International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam**, v.242, p.207-211, 2002.

ANTONIOU, C.; KOSMADAKI, M.G.; STRATIGOS, A.J.; KATSAMBAS, A.D. Sunscreens what's important to know. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology**, Amsterdam, v. 22, p. 1110-1119, 2008.

AULTON, M .E. Transdermal drug delivery. In: BARRY, B. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. London: Churchill Livingstone, 2002. 33, p. 499-533.

AUTIER, P.; DORÉ, J. F.; NÉGRIER, S.; LIÉNARD, D.; PANIZZON, R.; LEJEUNE, F. J.; GUGGISBERG, D.; EGGERMONT, A. M. M. Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 91, n. 15, p. 1304-1309, 1999.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: M. Dekker, 1983.

BERTON, A.; GODEAU, G.; EMONARD, H.; BABA, K.; BELLON, P.; HORNEBECK, W.; BELLON, G. Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. **Matrix Biology**, Stuttgart, v.19, n.2, p.139-148, 2000.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DE CARLO, A.; ENGLE, J.A. Matrix metalloproteinases: A review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Boca Raton, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BONAMIGO, R.R.; PEUKERT, C.; BERTI, C. Gelatinases A and B in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.76, n.4, p. 463-466, 2001.

BONDA, C. Research pathways to photostable sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.123, n. 2, p. 49-60, 2008.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 78, p. 206–209, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª edição, revista – Brasília : Anvisa, 2008. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf>. Acesso em: 13 de jul. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Série qualidade 1, 2004. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm>. Acesso em: 26 de jun. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>. Acesso em: 25 de jan. 2009.

BUTT, S.T.; CHRISTENSEN, T. Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. **Radiation Protection Dosimetry**, Ashford, v. 91, p. 283-286, 2000.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R.M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. II **Farmaco**, Amsterdam, v.55, p.526-534, 2000.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico-químico e avaliação da eficácia in vivo**. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in sem pêlos mice. **Journal of photochemistry and photobiology B: biology**, Lausanne, v. 84, p. 21-27, 2006.

CHEVION, M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. **Free radical biology & medicine**, New York, v.5, p. 27-37, 1988.

CHIEN, W.Y. **Novel drug delivery systems**. Drug and the pharmaceutical sciences, v.50. New York:M Dekker, 1992.

DALLE CARBONARE, M.; PATHAK, M.A. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, Lausanne, v. 14, p.105-124, 1992.

DEMACQ, C.; METZGER, I. F.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 394, p. 72-76, 2008.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.27, n. 10, p.873-887, 2008.

DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.37, p.191-205, 1999.

DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

DURAND, L.; HABRAN, N.; HENSCHER, V.; AMIGHI, K. *In vitro* evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v.31, p.279-292, 2009.

FERNANDEZ, C.; NIELLOUD, F.; FORTUNÉ, R.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of *in vivo* human penetration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.28, p.57-63, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FLIGIEL, S. E. G.; VARANI, J.; DATTA, S. C.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Collagen degradation in aged/photodamaged skin *in vivo* and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 120, n. 5, p. 842-848, 2003.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.1, p. 153-158, 2007.

FONSECA, Y.M.; CATINI, C.D.; VICENTINI, F.T.M.C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R.F.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.127, p. 596-601, 2010.

FREIRE, B.F.A.; QUELUZ, T.H.A.T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **Jornal de pneumologia**, São Paulo, v.21, n.4, p.180-184, 1995.

FUCHS, J.; HUFLEJT, M.E.; ROTHFUSS, L.M.; WILSON, D.S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v.93, p.769-773, 1989.

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

GERLACH, R.F.; DEMACQ, C; JUNG, K.; TANUSSANTOS, J.E. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. **Clinical Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 119-123, 2007.

GIL, E.M.; KIM, T.H. UV-induced immune suppression and sunscreen. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, Copenhagen, v. 16, p. 101-110, 2000.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M. **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p.60. 559p.

GONZALES, H.; FARBROT, A.; LARKO, O.; WENNBERG, A. M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 154, p. 337–340, 2006.

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

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GUARANTINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.1, p. 206-213, 2007.

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

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 571, p.107–120, 2005.

HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in *ex vivo* human skin. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 76, p. 57-63, 2002.

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

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

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, New York, v.74, p.214-226, 1976.

HO, J. N.; LEE, Y. H.; PARK, J. S.; JUN, W. J.; KIM, H. K.; HONG, B. S.; SHIN, D. H.; CHO, H. Y. Protective effects of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 7, p. 1244-1248, 2005.

International Conference on Harmonisation – ICH. **Guidance for industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Novembro, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=333> . Acesso em: 22/09/2008.

JANJUA, N. R.; MOGENSEN, B.; ANDRESON, 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**, Baltimore, v.123, p. 57-61, 2004.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, Lausanne , v. 123, p. 801-810, 2002.

JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 272, p. 45-55, 2004.

KANG, S.; CHUNG, J.H.; LEE, J.H.; FISHER, G.J.; WAN, Y.S.; DUELL, E.A.; VOORHEES, J.J. Topical n-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v.120, n.5, p.835-841, 2003.

KLINUBOL, P.; ASAWANONDA, P.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.P. Transdermal penetration of UV filters. **Skin Pharmacology and Physiology**, Basel , v.21, p.23-29, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77. n. 5, p. 1-8, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALLI, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265, 1951.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BADRA, M. U. L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v. 79, p. 8-11, 1992.

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

MANICONE, A.M.; MCGUIRE, J.K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Seminars in Cell & Development Biology**, London, v. 19, p.34-41, 2008.

MATÉS, J. M.; GOMES, C.P.; CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 4, p. 339-345, 1999.

MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, J. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 44, p. 6049-6055, 1969.

MIYACHI, Y.; IMAMURA, S.; NIWA, Y. Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultravioleta radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase pretreatment. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 89, p.111-112, 1987.

MONTI, D.; SAETTON, M. F.; CENTINI, M.; ANSELM, C. Substantivity of sunscreens. "In vitro" evaluation of the transdermal permeation characteristics of some benzophenone derivatives. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v.15, p.45-52, 1993.

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**, Stuttgart, v.52, p.103-112, 2001.

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

NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: SMITH, E.W.; MALBACH, H.I.; SURBER, C. **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**. 1 ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 2000. 7, p. 259-270.

NOHYNEK, G.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 33, p. 285-299, 2001.

ONOU, S.; KOBAYASHI, T.; TAKEMOTO, Y.; SASAKI, I.; SHINKAI, H. Induction of metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation. **Journal of Dermatological Science**, Clare, v. 33, n. 2, p. 105-111, 2003.

OXLUND, H.; ANDREASSEN, T.T. The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. **Journal of Anatomy**, London, v.131, n.4, p. 611-620, 1980.

PENCE, B. C.; NAYLOR, M. F. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in sem plos mice. **The Society of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 213-216, 1990.

RAMPAUL, A.; PARKIN, I.P.; CRAMER, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 191, p. 138-148, 2007.

RASILAINEN, S.; NIEMINEN, J. M.; LEVONEN, A. L.; OTONKOSKI, T.; LAPATTO, R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 63, n. 7, Abr., p. 1297-1304, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SANTORO, M.I.R.M.; OLIVEIRA, D.A.G.C.E.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SINGH, A.K. The effect of packaging materials on the stability of sunscreen emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 297, p. 197-203, 2005.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H.A.E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 803, p. 225-231, 2004.

SCHAKEL, D.J.; KALSBECK, D.; BOER, K. Determination of sixteen UV filters in suncare formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1049, p. 127-130, 2004.

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

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER, L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 100, n. 3, p. 260-265, 1993.

SHINDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; PACKER, L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 102, n. 4, p. 470-475, 1994.

SIERENS, J.; HARTLEY, J.A.; CAMPBELL, M.J.; LEATHEM, A.J.C; WOODSIDE, J.V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 485, p. 169-176, 2001.

SOUNNI, N. E.; NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, Paris, v. 87, p. 329-342, 2005.

TALLEC, P.; KORWIN-ZMIJOWSKA, C.; ADOLPHE, M. Effects of simulated solar radiation on type I and type III collagens, collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) gene expression in human dermal fibroblasts cultured in collagen gels. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 42, p. 226-232, 1998.

TOUITOU, E.; GODIN, B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 26, p. 375-379, 2008.

TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and SPF of ultraviolet filters from two vehicles. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 13, p. 770-774, 1996.

TRUSH, M.A.; EGNER, P.A.; KENSLER, T.W. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, p. 143-147, 1994.

VARANI, J.; SPEARMAN, D.; PERONE, P.; FLIGIEL, S.E.; DATTA, S.C.; WANG, Z.Q.; SHAO, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 158, p. 931-942, 2001.

VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 53-57, 2006.

VAYALIL, P.K.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 mouse skin. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 24, p. 927-936, 2003.

VAYALIL, P.K.; MITTAL, A.; HARA, Y.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 122, n. 6, p. 1480-1487, 2004.

VICENTINI, F. T. M. C.; SIMI, T. R. M.; CIAMPO, J. O. D.; WOLGA, N. O.; PITOL, K.L.; IYOMASA, M. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin in w/o

microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 69, p. 948-957, 2008.

VICENTINI, F.T.M.C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**. Tese de doutorado - Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v.19, p. 452-459, 2001.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, Amsterdam, v.1, S1-S8, 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.1399.53.4), intitulado: "Avaliação da Segurança de Filtros Solares Utilizados em Formulações Fotoprotetoras", de autoria de **Fernanda Maria Pinto Vilela** e de **Maria José Vieira Fonseca**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.12.2008.

Ribeirão Preto, 3 de dezembro de 2008

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro