UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de
formulações fotoprotetoras bioativas

Deborah de Oliveira Nishikawa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de
formulações fotoprotetoras bioativas

Deborah de Oliveira Nishikawa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte (a autora)

Ficha Catalográfica

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

Nishikawa, Deborah de Oliveira
N724d Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de
formulações fotoprotetoras bioativas / Deborah de Oliveira
Nishikawa. -- São Paulo, 2012.
91p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Baby, André Rolim

1. Filtro solar : Cosméticos : Tecnologia 2. Proteção solar :
Cosméticos I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.

668.55 CDD

Deborah de Oliveira Nishikawa

Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de
formulações fotoprotetoras bioativas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Arminda** e **Paulo**,
À minha irmã, **Suzana**,
Aos meus avós maternos, **Maria** e **Américo**, e paternos (*in memoriam*), **Sumi** e **Seiichi**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. André Rolim Baby.**

À **Prof.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco.**

À **Prof.^a Dr.^a Nádia Araci Bou-Chacra.**

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli** e à **Prof.^a Dr.^a Letícia Norma Carpentieri Rodrigues**

À **Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Débora Granemann e Silva, Fernanda Daud Sarruf e Paula Souza Prestes.**

À **Kamila Vanini Leitão.**

À **Elisabete Claro de Souza Paiva e David O. de Lima Filho.**

Ao **Jorge Alves de Lima e Elaine Midori Ychico.**

À **Daniela D’Almeida Peres e André Gomes Leão.**

Aos meus queridos amigos **Alef Kurita, Alessandra Matias Pires, Carla Andrea Trapé, Hugo de Campos Braga, Marco Antonio Tritapepe, Matheus Malta de Sá, Mirella de Luca, Rita Tritapepe, Tatiana Crescenzo e Thiago Didone.**

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Ciência e Tecnologia) pela concessão da bolsa de fomento.

A todos que fizeram parte deste trabalho e que imensamente enriqueceram mais uma etapa da minha vida!

RESUMO

NISHIKAWA, D.O. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e estabilidade de formulações fotoprotetoras bioativas.** 2012. 91f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A exposição ao sol traz benefícios à saúde, no entanto, o excesso pode ocasionar danos cutâneos agudos e crônicos, dentre os quais se destacam as neoplasias. A fotoproteção é um método para a prevenção dos efeitos danosos da radiação ultravioleta (UV) e a biodiversidade Brasileira é campo fértil para as pesquisas nesta área. Dessa forma, os objetivos da presente pesquisa envolveram o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras bioativas contendo rutina ou quercetina (compostos bioativos) e filtros solares físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco); a caracterização das formulações por meio de ensaios físico (viscosidade aparente) e físico-químico (valor de pH); a determinação da eficácia fotoprotetora estimada por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração; e a avaliação da estabilidade das preparações por meio do Teste de Estabilidade Normal (TEN). Na etapa do Desenvolvimento, a preparação composta por Dermabase® vegetal (10,0% p/p); sistema umectante (8,0% p/p); sistema emoliente (6,0% p/p); sistema quelante/antioxidante (0,6% p/p); sistema conservante (1,0% p/p); e água destilada recém destilada (74,4% p/p), foi selecionada como a formulação-base. As preparações contendo os compostos bioativos e ativos, isolados ou em associações, possuíram valores de pH biocompatíveis com o da pele, abrangendo o intervalo de 4,28 (5,0% p/p de rutina) a 7,58 (5,0% p/p de dióxido de titânio); aspecto de creme com intervalo de viscosidade aparente entre 12400 (5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 2,5% p/p de quercetina) e 31900 cP (5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 5,0% p/p de rutina); eficácia fotoprotetora estimada na faixa de fator de proteção solar (FPS) de 2,1 (2,5% p/p de quercetina) a 45,3 (5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 5,0% p/p de quercetina); e amplo espectro de proteção com valor mínimo de comprimento de onda crítico igual a 377 nm (5,0% p/p de óxido de zinco). Por meio do TEN, as preparações contendo os compostos bioativos e ativos isolados ou a associação dos filtros solares físicos se mantiveram estáveis para os parâmetros de aspecto, FPS estimado, comprimento de onda crítico, valor de pH e viscosidade aparente, nas condições de armazenamento de $22,0 \pm 2,0$ °C; $5,0 \pm 2,0$ °C – exceto para a viscosidade aparente – e $40,0 \pm 2,0$ °C (120 dias). As associações dos filtros físicos com os compostos bioativos se apresentaram instáveis. Apesar das respostas favoráveis que os flavonoides apreciaram, sugeriram-se que novas pesquisas poderiam ser conduzidas com a finalidade de contornar tais problemas, inclusive, realizando a comprovação da eficácia antissolar *in vivo* das preparações de melhor desempenho.

Palavras-chave: Estabilidade de produtos cosméticos. Flavonoides. Fotoproteção. Quercetina. Rutina.

ABSTRACT

NISHIKAWA, D.O. **Development, evaluation of the effectiveness and stability of bioactive sunscreens.** 2012. 91f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Exposition to sunlight promotes health benefits, however, its excess may cause acute and chronic cutaneous damages, including neoplasias. Photoprotection is a preventive approach against ultraviolet (UV) radiation deleterious effects and Brazilian biodiversity is an interesting field to the progress of researches in this science segment. The objectives of this research were the development of bioactive sunscreens containing rutin or quercetin (bioactive compounds) and inorganic UV filters (titanium dioxide and zinc oxide); the preparations' physical (apparent viscosity) and physicochemical (pH value) characterization; the *in vitro* evaluation of the formulations' photoprotective efficacy by diffuse reflectance spectrophotometry equipped with integrated sphere; and the sunscreens' stability analysis by Normal Stability Testing (NST). The vehicle was developed with the following components: Dermabase[®] vegetal (10.0% w/w); humectant system (8.0% w/w); emollient system (6.0% w/w); antioxidant/chelating system (0.6% w/w); preservatives (1.0% w/w); and distilled water/aqua (74.4% w/w). Formulations containing the bioactive and the UV filters, isolated or in association, were skin biocompatible with interval of pH values from 4.28 (rutin 5.0% w/w) to 7.58 (titanium dioxide 5.0% w/w); apparent viscosity values of 12400 (zinc oxide 5.0% w/w + titanium dioxide 5.0% w/w + quercetin 2.5% w/w) to 31900 cP (zinc oxide 5.0% w/w + titanium dioxide 5.0% w/w + rutin 5.0% w/w); *in vitro* photoprotection activity by sun protection factor (SPF) ranging from 2.1 (quercetin 2.5% w/w) to 45.3 (zinc oxide 5.0% w/w + titanium dioxide 5.0% w/w + quercetin 5.0% w/w); and broad spectrum property with minimum critical wavelength of 377 nm (zinc oxide 5.0% w/w). By NST, sunscreens with isolated bioactive and active compounds or the UV filters' association were considered stable during 120 days for the following parameters: aspect, *in vitro* SPF, critical wavelength, pH value and apparent viscosity when samples were stored at 22.0 ± 2.0 °C; 5.0 ± 2.0 °C (excluding apparent viscosity) and 40.0 ± 2.0 °C. Associations of UV filters with bioactive compounds were instable. Although the favorable results that flavonoids have achieved, it is suggested further researches aiming at to overcome the identified inconvenient, performing the *in vivo* SPF determination on best performance formulations to prove the estimated *in vitro* data.

Key-words: Flavonoids. Photoprotection. Quercetin. Rutin. Stability of cosmetic products.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1.	Espectro de radiação solar	4
Figura 2.	Melanoma	7
Figura 3.	Carcinoma basocelular	7
Figura 4.	Carcinoma espinocelular	7
Figura 5.	Estrutura química do flavonoide, rutina (a); do filtro UVA, benzofenona-3 (b); e do filtro UVB, <i>p</i> -metoxicinamento de octila (c)	11
Figura 6.	Geometria difusa/normal ($d/0^\infty$). Adaptação de Springsteen e colaboradores, 1999	26
Figura 7.	Aspecto da formulação D6 após o preparo (A) e após 24 horas de repouso (B)	29
Figura 8.	Aspecto das formulações D12, D13, D14 e D15 após o teste da centrifugação	32
Figura 9.	Variação do valor de pH na formulação D12. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	37
Figura 10.	Variação do valor de pH na formulação D13. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	38
Figura 11.	Variação do valor de pH na formulação D14. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	38
Figura 12.	Variação do valor de pH na formulação D15. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	39
Figura 13.	Aspecto das formulações Polawax [®] (D14) e Dermabase [®] vegetal (D15) após 14 dias na condição de temperatura elevada ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	40
Figura 14.	Aspecto da formulação D12 após 14 dias na condição de <i>freezer</i> ($-10,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$)	41
Figura 15.	Espectro médio de absorbância da formulação F1	44

Figura 16. Aspecto das formulações F3 e F5 no 30º dia do Teste de Estabilidade Normal.....	46
Figura 17. Sobreposição dos perfis espectrais da absorbância da formulação F3 nas condições inicial e após 30 dias em temperatura elevada .	52
Figura 18. Perfil espectral da formulação F6 (condição inicial).....	54
Figura 19. Sobreposição dos perfis espectrais da absorbância das formulações F15 e F16 na condição inicial (t0)	71
Figura 20. Sobreposição dos perfis espectrais da absorbância das formulações F17, F18, F19 e F20 na condição inicial (t0)	73

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1.	Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações	18
Tabela 2.	Associação qualitativa e quantitativa (% p/p) dos compostos ativos e bioativos.....	24
Tabela 3.	Teste de Estabilidade Acelerada da formulação D12: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp).....	33
Tabela 4.	Teste de Estabilidade Acelerada da formulação D13: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp).....	34
Tabela 5.	Teste de Estabilidade Acelerada da formulação D14: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp).....	35
Tabela 6.	Teste de Estabilidade Acelerada da formulação D15: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp).....	36
Tabela 7.	Teste de Estabilidade Normal da formulação F1: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	43
Tabela 8.	Teste de Estabilidade Normal da formulação F2: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	47
Tabela 9.	Teste de Estabilidade Normal da formulação F3: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	48
Tabela 10.	Teste de Estabilidade Normal da formulação F4: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	49
Tabela 11.	Teste de Estabilidade Normal da formulação F5: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	50

Tabela 12. Teste de Estabilidade Normal da formulação F6: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	55
Tabela 13. Teste de Estabilidade Normal da formulação F7: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	58
Tabela 14. Teste de Estabilidade Normal da formulação F8: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	59
Tabela 15. Teste de Estabilidade Normal da formulação F9: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	60
Tabela 16. Teste de Estabilidade Normal da formulação F10: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	61
Tabela 17. Teste de Estabilidade Normal da formulação F11: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	64
Tabela 18. Teste de Estabilidade Normal da formulação F12: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	65
Tabela 19. Teste de Estabilidade Normal da formulação F13: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	66
Tabela 20. Teste de Estabilidade Normal da formulação F14: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	67
Tabela 21. Teste de Estabilidade Normal da formulação F15: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	69
Tabela 22. Teste de Estabilidade Normal da formulação F16: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	70

Tabela 23. Teste de Estabilidade Normal da formulação F17: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	74
Tabela 24. Teste de Estabilidade Normal da formulação F18: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	75
Tabela 25. Teste de Estabilidade Normal da formulação F19: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	76
Tabela 26. Teste de Estabilidade Normal da formulação F20: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais <i>in vitro</i>	77

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1. Equipamentos selecionados para uso na presente pesquisa	15
Quadro 2. Matérias-primas e compostos ativos: denominações comercial, química, INCI, fornecedor e orientação de inclusão na fase aquosa, oleosa ou complementar da emulsão O/A	17
Quadro 3. Características organolépticas (aspecto, cor e odor) das formulações após 24 horas do preparo	28
Quadro 4. Avaliação Preliminar da Estabilidade (Teste da centrifugação e do estresse térmico)	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APE	–	Avaliação Preliminar da Estabilidade
COLIPA	–	<i>European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i>
DEM	–	Dose Eritematógena Mínima
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
FPA-PPD	–	<i>Persistent Pigment Darkening</i>
FPS	–	Fator de Proteção Solar
IPD	–	<i>Immediate Pigment Darkening</i>
IV	–	Infravermelho
LM	–	Levemente Modificada
M	–	Modificada
N	–	Normal
O/A	–	Óleo em água
PMMA	–	Polimetil Metacrilato
rpm	–	Rotações por minuto
SUS	–	Sistema Único de Saúde
TEA	–	Teste de Estabilidade Acelerada
TEN	–	Teste de Estabilidade Normal
UV	–	Ultravioleta
UVA	–	Ultravioleta A
UVB	–	Ultravioleta B
UVC	–	Ultravioleta C
Vis	–	Radiação Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Luz solar e a radiação ultravioleta	3
2.2	Benefícios e malefícios da radiação UV	5
2.3	Câncer de pele	6
2.4	Fotoproteção	8
2.4.1	Eficácia Antissolar	9
2.4.2	Flavonoides na fotoproteção	11
3	OBJETIVOS	14
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1	Equipamentos	15
4.2	Desenvolvimento das formulações.....	15
4.2.1	Procedimento de preparo.....	19
4.2.2	Seleção das formulações.....	20
4.2.3	Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)	20
4.2.4	Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	21
4.3	Combinação qualitativa e quantitativa (% p/p) dos compostos bioativos e ativos	23
4.4	Teste de Estabilidade Normal (TEN).....	24
4.4.1	Caracterização funcional <i>in vitro</i> das preparações: fator de proteção solar estimado e propriedades anti-UVA	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Desenvolvimento das formulações.....	27
5.1.1	Preparo das formulações	27
5.1.2	Seleção das formulações	27
5.1.3	Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)	30
5.1.4	Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)	32
5.2	Teste de Estabilidade Normal (TEN).....	41
5.2.1	Base emulsionada sem compostos ativos (F1).....	41
5.2.2	Formulações contendo todos os compostos ativos (F2, F3, F4 e F5)	45
5.2.3	Combinação entre dióxido de titânio e óxido de zinco (F6).....	53
5.2.4	Combinação entre dióxido de titânio e flavonoides (F7, F8, F9 e F10).....	56
5.2.5	Combinação entre óxido de zinco e flavonoides (F11, F12, F13 e F14).....	62

5.2.6	Compostos ativos isolados: comparação entre dióxido de titânio (F15) e óxido de zinco (F16)	68
5.2.7	Compostos ativos isolados: rutina (F17 e F18) e quercetina (F19 e F20)	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO A – Carta de submissão de manuscrito para periódico científico.....	89
	ANEXO B – Resumo/<i>abstract</i> do manuscrito submetido para periódico científico.....	90

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na Indústria Cosmética, a inovação no desenvolvimento de produtos é o fator que gera vantagem competitiva em relação aos concorrentes. O mercado de protetores solares tem apresentado aumento. De 1992 a 2002, o mercado nacional de fotoprotetores passou de 650 toneladas de produtos para 4200 toneladas de produtos. Tais números revelam não apenas a crescente importância deste segmento como, também, sugere o potencial elevado do crescimento para os próximos anos, entretanto, os fotoprotetores ainda não representam o ideal de proteção, devido ao uso inadequado, ao alto custo e à proteção espectral incompleta, dentre outros. Os protetores solares atuam como adjuvantes na redução da incidência de câncer de pele e dos sinais de envelhecimento, porém, atualmente, devido ao histórico dos eventos adversos ocasionados pelo uso tópico de filtros químicos em proporções consideráveis e necessárias para a obtenção de fator de proteção solar (FPS) mais elevado, a tendência no mercado de fotoprotetores é o desenvolvimento de formulações contendo reduzida concentração desses, ainda com manutenção da proteção ampla frente às radiações UVA e UVB.

Apesar da disponibilidade de diferentes classes de filtros solares e substâncias naturais isoladas, o mercado não dispõe de formulações fotoprotetoras possuindo associações de filtros solares com flavonoides isolados. A rutina tem sido foco de estudos do *Grupo de Cosmetologia* da *FCF-USP*, que verificou que esta se apresenta ausente da tendência de penetração cutânea, além de possuir características químicas que a torna potencial composto ativo para formulações fotoprotetoras. Em concordância com este panorama, o presente trabalho envolveu o desenvolvimento e caracterização física, físico-química e funcional de formulações fotoprotetoras bioativas, de estabilidade adequada, amplo espectro de proteção contra as radiações UVA e UVB, ausentes de filtros solares químicos, com o objetivo de avaliar o uso dos flavonoides rutina e quercetina como filtros solares. Este trabalho avaliou, também, a estabilidade das formulações contendo

flavonoides, associados ou não aos filtros físicos dióxido de titânio e óxido de zinco.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Luz solar e a radiação ultravioleta

A luz solar incidente sobre a superfície terrestre é composta por radiação eletromagnética, dividida em três intervalos majoritários de acordo com seu comprimento de onda: ultravioleta (UV) (100-400 nm), visível (Vis) (400-800 nm), e infravermelho (IV) (> 800 nm). Tal classificação foi proposta W.W. Coblentz, aproximadamente, na década de 1930 e adotada internacionalmente (SVOBODOVA, WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006; PALM & O' DONOGHUE, 2007).

O corpo humano percebe as diferentes faixas de radiação do espectro solar de diferentes maneiras. A radiação infravermelha (IV) é percebida na forma de calor, a radiação Vis é detectada pelo sistema óptico por meio das cores e a radiação UV, pelas reações fotoquímicas. Tais reações podem estimular a produção de melanina, com consequente bronzeamento da pele, ou podem provocar inflamações e, até, queimaduras graves. Também há a possibilidade de ocorrerem mutações genéticas e comportamentos anormais das células (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

A energia da radiação solar aumenta com a redução do comprimento de onda. Dessa forma, a radiação UV, por ser a de menor comprimento de onda é, por conseguinte, a mais energética e, deste modo, mais propensa a produzir reações fotoquímicas. Outra consideração importante se refere à capacidade dela em penetrar a estrutura da pele. A radiação UV de menor energia penetra mais profundamente na pele e, ao atingir a derme, provoca reações de fotoenvelhecimento (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

A radiação UV é uma fração restrita do espectro da radiação eletromagnético, como ilustrado na **Figura 1**, e é tradicionalmente subdividida em UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVA é, ainda, subdividida em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320-340 nm) (SVOBODOVA, WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006; PALM & O' DONOGHUE, 2007).

Figura 1. Espectro de radiação solar
(<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV.html>)

A radiação UVC é portadora de energia elevada, característica que a torna extremamente lesiva aos seres vivos. Entretanto, não é capaz de atingir a superfície terrestre devido à sua absorção pelo oxigênio, acima da camada de ozônio, presente na estratosfera (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

A radiação UVB possui energia alta e, com grande frequência, provoca queimaduras solares. Também induz o bronzeamento da pele, é responsável pela transformação do ergosterol epidérmico em vitamina D e causa o envelhecimento precoce das células. Pode causar lesões no DNA e suprimir a resposta imunológica da pele, o que pode reduzir a chance de uma célula maligna ser reconhecida e destruída pelo organismo (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

A radiação UVA é mais abundante que a radiação UVB na superfície terrestre e, quando comparadas, observa-se que a capacidade da radiação UVA em produzir eritema é consideravelmente menor, porém, penetra mais profundamente na derme. Induz pigmentação da pele por meio do escurecimento da melanina pela foto-oxidação da leucomelanina, localizada

nas células das camadas externas da epiderme. Histologicamente, causa danos ao sistema vascular periférico e pode induzir o câncer de pele. Pode, também, agir de maneira indireta, formando radicais livres (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007).

2.2 Benefícios e malefícios da radiação UV

A exposição ao sol pode ser benéfica para a saúde, pois contribui para o bem-estar físico e mental, sendo que a reduzida incidência solar em alguns países durante os meses de inverno está associada ao desenvolvimento de transtornos afetivos sazonais (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007; WILLEIT *et al.*, 2008).

A radiação UV auxilia na formação de vitamina D₃; em associação com determinados medicamentos, é utilizada no tratamento de doenças de pele, como psoríase e vitiligo, e pode ser benéfica no processo de cicatrização de ferimentos na pele. A produção de melanina, com consequente bronzeamento da pele, também, pode ser usada em alguns casos como tratamento de icterícia (cor amarela da pele e do branco dos olhos, causada pelo excesso de bilirrubina no sangue) (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007; RENNEKAMPFF *et al.*, 2010).

No entanto, a exposição em excesso pode causar danos cutâneos agudos e crônicos, reações inflamatórias, fotoenvelhecimento, queratose solar, neoplasias (carcinoma e melanoma), imunossupressão, sensibilização cutânea, reações fototóxicas e fotoalérgicas, dentre outras. A tendência ascendente da morbidade pode ser atribuída a múltiplos fatores. O aumento da incidência de raios UV, devido à diminuição da camada de ozônio atinge com mais intensidade as áreas próximas da região Antártida, modificando a distribuição geográfica de risco pela exposição à radiação UV, maior nas regiões equatoriais (WILKINSON & MOORE, 1990; PATHAK, 1997; MAVERAKIS *et al.*, 2010).

A exposição excessiva ao sol é o principal fator de risco de câncer de pele. O problema é agravado pela exposição constante e o aumento da expectativa de vida da população, uma vez que os danos causados pela

radiação UV são acumulativos. Nos últimos anos, houve aumento da exposição à radiação UV recreacional, principalmente na infância, devido à mudança de hábito de diferentes populações em relação à proteção mecânica e exposição solar cotidiana, como o uso de chapéus, sombrinhas e roupas que deixam o corpo mais exposto, valorização estética do bronzeamento da pele, o que, além de estimular a exposição solar sem proteção nos momentos de lazer, favorece o hábito do bronzeamento artificial. Outros fatores, tais como poluição e tabagismo, também contribuem para potencializar os efeitos nocivos da radiação UV (PENNA, 2006; POPIM *et al.*, 2008; AHMED *et al.*, 2008; FERREIRA & NASCIMENTO, 2008; BURKE & WEI, 2009; YU *et al.*, 2009; MADERA *et al.*, 2010).

A camada de ozônio absorve, aproximadamente, 95% da radiação UVB, no entanto, não absorve a UVA (SCOTTI & VELASCO, 2003; SVOBODOVA, WALTEROVA e VOSTALOVA, 2006). Além disso, o aumento na incidência da radiação UVB, devido à degradação desta camada, está associado ao aumento na incidência do câncer de pele em todo o planeta (NARAYANAN, SALADI e FOX, 2010; CHANG *et al.*, 2010).

2.3 Câncer de pele

Dentre os tipos de câncer de pele, são citados os melanomas e os não melanomas, dentre os quais estão o carcinoma basocelular e o espinocelular. O câncer de pele é a neoplasia de maior incidência em várias partes do mundo e, também, no Brasil. A mudança de hábitos de exposição solar da população vem provocando tendência no aumento da incidência, morbidade e mortalidade por câncer de pele nos últimos anos, o que impõe sua consideração como problema de saúde pública. Apesar de possuir excelente prognóstico, quando detectado em estágio inicial, ele pode ser prevenido com medidas adequadas de proteção solar. O uso de protetores solares é, portanto, crucial na prevenção do aumento da incidência desse tipo de câncer (SANTORO *et al.*, 2005; PENNA, 2006; FLOR, DAVOLOS & CORRÊA, 2007; KOLM, HOFBAUER & BRAUN, 2010; NARAYANAN, SALADI & FOX, 2010).

Figura 2. Melanoma

(<http://www.dermatologia.net/novo/base/doencas/melanoma.shtml>)

Figura 3. Carcinoma basocelular
(<http://www.dermatologia.net/novo/base/doencas/baso.shtml>)

Figura 4. Carcinoma espinocelular

(<http://www.dermatologia.net/novo/base/cancer2.shtml>)

Apesar de já existirem no mercado formulações fotoprotetoras diversas, muitas não protegem adequadamente contra a radiação UVA. Apesar de a radiação UVB ser a principal responsável pelo desenvolvimento de câncer de pele, a UVA age sinergicamente com a UVB, aumentando o risco do desenvolvimento de neoplasias cutâneas, além de causar fotoenvelhecimento. Diante disso, fica evidente a necessidade de proteger a pele de toda faixa UVA/UVB, para reduzir o risco de câncer de pele causado pelo sol (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007; BURKE & WEI, 2009).

Estudo aponta que, no Brasil, o custo total de tratamento dos melanomas malignos diagnosticados no estágio inicial, em valores de 2007, foi estimado em R\$ 33.012.725,10 para o Sistema Único de Saúde (SUS) e R\$ 76.133.662,80 para os convênios (SOUZA *et al.*, 2009).

2.4 Fotoproteção

A fotoproteção é um método para a prevenção dos efeitos danosos da radiação UV. Esta abordagem é realizada por meio do uso de fotoprotetores que são a primeira linha de proteção da radiação UV, vestimentas e exposição segura ao sol. Os fotoprotetores podem ser compostos de vários filtros UV, incluindo filtros inorgânicos (físicos) e orgânicos (químicos). Os filtros químicos são moléculas orgânicas, hidro ou lipossolúveis, capazes de absorver radiação UV e a transformar em radiações inócuas ao ser humano. Essencialmente, são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático. O mecanismo de ação dos filtros químicos envolve a absorção da radiação UV e, em seguida, a excitação do orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para o orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia). Tais moléculas, ao retornarem aos seus estados fundamentais, liberam o excesso de energia absorvida na forma de calor, por exemplo (SHAATH, 1997; GIOKAS, SALVADOR & CHISVERT, 2007; FLOR, DAVOLOS & CORRÊA, 2007).

Os filtros físicos ou inorgânicos, por sua vez, são constituídos de partículas que agem como barreira física sobre a pele, refletindo, espalhando e/ou absorvendo a radiação UV (SCOTTI & VELASCO, 2003). Os filtros solares físicos comumente utilizados são o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO). Esses representam a forma mais segura e eficaz de proteger a pele, pois apresentam potencial reduzido de irritação, sendo recomendado no preparo de fotoprotetores para uso infantil ou para pessoas com pele sensível. Os óxidos usados como filtros solares devem ficar suspensos na formulação, sendo o seu tamanho de partícula de suma importância, tanto na eficácia do

fotoprotetor como, também, na aparência cosmética do produto. Ponto negativo na utilização desse tipo de filtro solar é a tendência em deixar película branca sobre a pele, o que pode ser esteticamente desagradável. A fim de minimizar o efeito, há versões microparticuladas dos filtros físicos (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007). O tamanho reduzido da partícula não confere e não promove aumento de toxicidade, portanto, é seguro para uso em formulações cosméticas fotoprotetoras (SCHILLING *et al.*, 2010).

2.4.1 Eficácia Antissolar

A eficácia dos fotoprotetores pode ser determinada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Vários parâmetros devem ser avaliados para determinar a eficácia de uma formulação fotoprotetora. O valor do FPS está relacionado à proteção proporcionada frente à radiação UVB. O FPS pode ser definido como o quociente entre a dose eritematogênica mínima (DEM) na pele protegida com o fotoprotetor em análise e a DEM na pele ausente de proteção. O DEM é a quantidade de energia efetiva, expressa em Joules/cm^2 , requerida para a produção da primeira reação eritematogênica perceptível e com bordas claramente definidas. Para análise de eficácia anti-UVA *in vivo*, o método mais comumente utilizado envolve o cálculo de FPA-PPD (*Persistent Pigment Darkening*). Esse princípio se baseia na resposta de pigmentação tardia ou persistente da pele frente à radiação UVA. Outro método utilizado é o cálculo de IPD (*Immediate Pigment Darkening*), que envolve a observação do escurecimento transitório da pele (bronzamento) (VELASCO *et al.*, 2011).

Como metodologias *in vivo* preconizadas mundialmente, tem-se: FDA (Estados Unidos da América), COLIPA (Europa) e SAA (Austrália e Nova Zelândia). Os ensaios *in vivo* requerem planejamento criterioso, tempo de realização elevado, voluntários saudáveis, profissionais qualificados e instalações adequadas, dentre outras exigências, o que acarreta em prestações de serviços e estudos onerosos. Ensaios *in vitro* foram desenvolvidos, como os espectrofotométricos, que se baseiam na análise do espectro de absorção ou de transmissão da radiação UV. Dentre os métodos espectrofotométricos, há o descrito por Mansur (MANSUR *et al.*, 1986), no qual

de são analisadas soluções diluídas dos fotoprotetores em solvente adequado e analisadas em espectrofotômetro. Este método possui limitações devido à dificuldade em solubilizar combinações de diferentes filtros solares em concentrações variadas, além de impossibilitar a avaliação de formulações contendo filtros solares físicos. Uma alternativa para esse método baseia-se na determinação do espectro de transmissão ou reflexão obtido em espectrofotômetro de refletância com esfera de integração. Nesse caso, os fotoprotetores são aplicados na forma de um filme sobre uma superfície adequada (FPS espectrofotométrico por meio de filme), não havendo a necessidade da obtenção de soluções das amostras, o que viabiliza a avaliação filtros físicos (DIFFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2011).

Para avaliação da eficácia anti-UVA *in vitro*, é calculada a razão UVA/UVB, que envolve a medida de absorção da formulação no intervalo de 290 a 400 nm. Após esse processo, é feito o cálculo da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB. A razão entre a curva UVA/UVB é determinada e associada com a proteção frente à radiação UVA. Os resultados podem ser expostos com estrelas, sendo que o maior número destas corresponde a uma maior proteção anti-UVA estimada (SAYRE *et al.*, 1980; MANSUR *et al.*, 1986; DIFFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2011).

Outro parâmetro usado para avaliar a eficácia anti-UVA é o comprimento de onda crítico (λ_c), que corresponde a 90% da curva integral de absorção entre os referidos comprimentos de onda. Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção à radiação UVA, deve apresentar valor de λ_c maior que 370 nm, após irradiação. Quanto maior o valor de comprimento de onda crítico, maior será a proteção com relação à radiação UVA, assim, de amplo espectro de atuação. No entanto, o comprimento de onda crítico não leva em consideração a intensidade de todo espectro, possibilitando que um filtro com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de λ_c que outro, com proteção superior (VELASCO *et al.*, 2011).

2.4.2 Flavonoides na fotoproteção

Atualmente, mais de 8.000 flavonoides foram identificados, e alguns demonstraram propriedades fotoprotetoras em potencial quando utilizados topicamente (PINNELL, 2003).

Os flavonoides apresentam moléculas com estrutura semelhante aos filtros químicos, como ilustrado na **Figura 5**. Adicionalmente às suas propriedades antioxidantes e à similaridade de seus espectros de absorção, tais compostos de origem natural podem exercer atividade fotoprotetora ou aperfeiçoar o valor do FPS, mesmo com a redução da concentração dos filtros químicos (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

Figura 5. Estrutura química do flavonoide, rutina (a); do filtro UVA, benzofenona-3 (b); e do filtro UVB, *p*-metoxicinamato de octila (c) (VELASCO *et al.*, 2008a)

A Indústria Brasileira de produtos cosméticos apresenta crescimento considerável na produção de produtos formulados com insumos e compostos ativos naturais e de base vegetal visando o mercado externo, principalmente o europeu e o norte-americano (ABIHPEC, 2009). Empresas investem em produtos de origem vegetal em sua linha. Nos últimos cinco anos, parte expressiva das exportações de cosméticos produzidos no país, muitos deles formulados com compostos ativos e insumos provenientes de base vegetal, alcançou crescimento acumulado de 165%, correspondendo à soma de US\$ 537,5 milhões, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético (ABIHPEC). Crescimento que eleva ainda mais a importância de um setor com taxas de crescimento maiores do que as do próprio setor industrial Brasileiro. De 1996 a 2009, enquanto a Indústria cresceu 45,7%, os produtos cosméticos aumentaram 307,0%. O carro-chefe das exportações brasileiras são os produtos fabricados a partir de frutas, sementes e outros ingredientes naturais. O interesse por insumos advindos da Amazônia é ainda maior entre os estrangeiros e tais produtos são presumivelmente de maior segurança em relação aos sintéticos, ainda mantendo eficácia adequada (ABIHPEC, 2009).

Velasco e colaboradores, a partir de 2008, apresentaram artigos sobre o tema “fotoproteção bioativa”, avaliando o flavonoide rutina e a incorporação de extratos vegetais em formulações fotoprotetoras. Os resultados do estudo com a rutina demonstraram que sua eficácia fotoprotetora foi dependente da concentração e da presença dos filtros químicos UVA e UVB, havendo sinergismo na elevação do FPS quando o flavonoide foi associado aos filtros nas concentrações mínimas (*p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3) em formulação específica. A rutina não associada aos filtros químicos exerceu proteção frente à radiação UVA superior à formulação ausente de compostos ativos e às suas associações (VELASCO *et al.*, 2008a). O resultado do estudo com os extratos vegetais de *Passiflora incarnata* L. e *Plantago lanceolata* demonstrou que a formulação com concentração de *P. incarnata* L. equivalente a 0,1% p/v de rutina, 7% p/v de *p*-metoxicinamato de octila, 2% p/v benzofenona-3 e 2% p/v de dióxido de titânio, se apresentou como formulação de amplo espectro, elevando a proteção contra a radiação UVA. A razão

UVA/UVB de 0,49 foi aumentada para 0,52 e o comprimento de onda crítico de 364 para 368,6 nm (VELASCO *et al.*, 2008b).

Pelo exposto, é evidente a importância da pesquisa de novos fotoprotetores na tentativa da diminuição da incidência do câncer de pele. Pesquisas de fotoprotetores bioativos, que contém extratos vegetais e compostos naturais isolados são relevantes, uma vez que dados da literatura confirmam que flavonoides isolados ou presentes em extratos vegetais padronizados demonstraram ter propriedades fotoprotetoras potentes quando aplicados topicamente na pele (PINNELL, 2003). A biodiversidade Brasileira é campo fértil para as pesquisas nesta área, extratos vegetais padronizados oriundos do Brasil são, possivelmente, potenciais antioxidantes que podem ser usados no desenvolvimento de fotoprotetores bioativos. A rotina tem potencial efeito sinérgico, elevando tanto o valor do FPS (fator de proteção solar), quanto o potencial de proteção anti-UVA, quando associado a filtros físicos (CHOQUENET *et al.*, 2008) e filtros químicos (BABY *et al.*, 2009).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Desenvolver e avaliar a estabilidade acelerada de formulações fotoprotetoras bioativas contendo rutina ou quercetina e filtros solares físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco).

3.2 Caracterizar as formulações por meio de ensaios físico (viscosidade aparente) e físico-químico (valor de pH).

3.3 Determinar a eficácia fotoprotetora *in vitro* por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.

3.4 Avaliar a estabilidade física, físico-química e funcional das preparações por meio do Teste de Estabilidade Normal.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

O **Quadro 1** descreve os equipamentos empregados no presente projeto.

Quadro 1. Equipamentos selecionados para uso na presente pesquisa

Equipamento	Marca	Modelo
Agitador mecânico	Ika [®]	RW 20.n
Balança analítica	Shimadzu [®]	AUY220
Balança semianalítica	Marte [®]	AS2000C
Banho termostatzado	Nova Ética [®]	N480
Câmara climática	Nova Ética [®]	420/CLD
Centrífuga	Hettich Zentrifugen [®]	Rotofix 32
Chapa aquecedora	Quimis [®]	Q310-223
Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração	Labsphere [®]	UV 2000S
Estufa	Nova Ética [®]	-
Freezer	Consul [®]	Slim 200
Hélice	Ika [®]	Modelo <i>dissolver</i>
pHmetro	Quimis [®]	G400AS
Refrigerador	Bosch [®]	Ecoplus 370
Termômetro	Incoterm [®]	-10 +110 °C, div 1 °C
Viscosímetro	Fungilab [®]	Visco Star R

4.2 Desenvolvimento das formulações

Nesta fase, foram realizados os seguintes procedimentos: manipulação de formulações semissólidas do tipo emulsão óleo-em-água (O/A), triagem das formulações aptas para a realização dos ensaios da Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) e do Teste de Estabilidade Acelerada (TEA).

Formulações semissólidas do tipo emulsão O/A foram desenvolvidas para a incorporação do composto bioativo (rutina ou quercetina) e filtros solares físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco). Os componentes ou matérias-primas adicionados ou não e em concentrações (% p/p) distintas

caracterizaram-se como as variáveis do processo do desenvolvimento das formulações.

As matérias-primas e compostos ativos utilizados encontram-se descritos no **Quadro 2**. A composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das preparações está descrita na **Tabela 1**.

Quadro 2. Matérias-primas e compostos ativos: denominações comercial, química, INCI, fornecedor e orientação de inclusão na fase aquosa, oleosa ou complementar da emulsão O/A

Nome comercial	Nome químico	Denominação INCI	Fornecedor	Fase
Polawax [®] GP-200	Álcool cetoestearílico (e) Estearato PEG-20	<i>Cetearyl alcohol (and) PEG-20 Stearate</i>	Croda	A
Dermabase [®] vegetal	Álcool cetoestearílico (e) estearato de glicerila (e) esterato de PEG-2 estearato (e) ácido esteárico (e) ceteth-10 (e) polisorbato 60 (e) manteiga de sementes de <i>Theobroma grandiflorum</i> (e) óleo de semente de <i>Helianthus annuus</i> (e) palmitato de cetila	<i>Cetearyl Alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-2 Stearate (and) Stearic Acid (and) Ceteth-10 (and) Polysorbate 60 (and) Theobroma grandiflorum seed butter (and) Helianthus annuus seed oil (and) Cetyl Palmitate</i>	Croda	A
Crodabase [®] SQ	Óleo mineral (e) polietileno	<i>Mineral Oil (and) Polyethylene</i>	Croda	A
Base líquida [®]	Óleo mineral (e) álcool de lanolina (e) álcool oleílico	<i>Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol</i>	Croda	C
Cutina [®] KD16	Monoestearato de glicerila (e) sabão de ácido esteárico	<i>Glyceryl Monodistearate (and) Stearic Acid Soap</i>	Chemspeccs	A
Crodamol [®] MM	Miristato de miristila	<i>Myristyl Myristate</i>	Croda	A
Tween [®] 20	Polisorbato 20	<i>Polysorbate 20</i>	Croda	A
Antaron [®] V220	VP / eicoseno Copolímero	<i>VP/Eicosene Copolymer</i>	ISP	A
Crodamazon [®] Buriti	Óleo do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i> (Buriti)	<i>Mauritia flexuosa Fruit Oil</i>	Croda	C
Crodamazon [®] Cupuaçu	Manteiga de semente de <i>Theobroma grandiflorum</i> (Cupuaçu)	<i>Theobroma grandiflorum Seed Butter</i>	Croda	A
Dow Corning [®] 9040 Silicone Elastomer Blend	Ciclopentasiloxano (e) crosspolímero de dimeticona	<i>Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer</i>	Dow Corning	C
BHT	BHT	<i>BHT</i>	Tec Pharma	A
Glicerina	Glicerina	<i>Glycerin</i>	Pharma Special	B
Sorbitol	Sorbitol	<i>Sorbitol</i>	Henrifarma	B
EDTA Dissódico	EDTA Dissódico	<i>Disodium EDTA</i>	Synth	B
Água destilada	Água destilada	<i>Water/aqua</i>	-	B
Dow Corning [®] 245 fluid	Ciclopentasiloxano	<i>Cyclopentasiloxane</i>	Dow Corning	C
Germall [®] 115	Imidazolidinil uréia	<i>Imidazolidinyl Urea</i>	Mapric	C
Phenova [®]	Butilparabeno (e) etilparabeno (e) Metilparabeno Fenoxietanol (e) (e) Propilparabeno	<i>Butilparaben (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Phenoxyethanol (and) Propylparaben</i>	Croda	C
Rutina	Rutina	<i>Rutin</i>	Opção Fênix	D
Quercetina	Quercetina	<i>Quercetin</i>	Opção Fênix	D
Oxido de zinco	Óxido de zinco	<i>Zinc oxide</i>	Vital Especialidades	D
Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	<i>Titanium dioxide</i>	Vital Especialidades	D

Legenda: INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* (BRANDÃO, 2000);
 (-) fornecedor não descrito, produto obtido no Laboratório de Cosmetologia da FCF-USP.

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações

		Proporção (% p/p)														
	Composição	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15
FASE A	Polawax® GP-200	7,0	5,0	5,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	10,0	-	10,0	-	10,0	-
	Dermabase® vegetal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	10,0	-	10,0
	Crodabase® SQ	7,0	5,0	5,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,0	3,0	-	-	-	-
	Crodamazon®	-	-	-	-	-	1,0	1,0	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-
	Cupuaçu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cutina® KD16	-	5,0	5,0	4,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
	Crodamol® MM	5,0	5,0	5,0	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-	-	-	-
	Tween® 20	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Antaron® V220	-	3,0	3,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-
FASE B	BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Glicerina	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	Sorbitol	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
	EDTA	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Água destilada qsp	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FASE C	Crodamazon® Buriti	-	-	-	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
	Dow Corning® 9040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	Silicone Elastomer Blend	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0
	Base líquida®	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0
	Dow Corning® 245 Fluid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	Germall 115®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Phenova®	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
FASE D	Rutina	-	-	5,0	5,0	5,0	-	3,0	-	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0
	Quercetina	-	-	-	5,0	5,0	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Óxido de zinco	-	-	-	5,0	5,0	-	3,0	-	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0
	Dióxido de titânio	-	-	-	5,0	5,0	-	3,0	-	5,0	-	-	-	-	5,0	5,0

Legenda: (-): matéria-prima não adicionada.

4.2.1 Procedimento de preparo

As matérias-primas foram agrupadas em Fases, de acordo com suas características físico-químicas, conforme apresentadas na **Tabela 1**.

FASE A

Os componentes da FASE A foram pesados em um béquer de vidro, em quantidade adequada para elaborar 50,0 g de preparação.

FASE B

Os componentes da FASE B foram pesados em outro béquer de vidro, em quantidade adequada para elaborar 50,0 g de preparação.

PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO

Realizou-se o aquecimento das FASES A e B, separadamente, à temperatura controlada de 75 – 80 °C. A seguir, a FASE B foi adicionada lentamente à FASE A, sob agitação constante, por período de 10 minutos à velocidade de 1000 rpm, empregando-se o agitador mecânico, com hélice tipo *dissolver*.

FASE C

Quando aplicável, o componente Dow Corning® 9040 Silicone Elastomer Blend foi disperso no componente Dow Corning® 245 fluid (DOW CORNING, 2010). Os demais componentes da FASE C foram pesados na quantidade para elaborar 50,0 g de preparação. Por apresentarem propriedades voláteis ou termolábeis, os componentes da presente fase foram adicionados, sob

agitação de 1000 rpm à emulsão resultante das FASES A e B, após esta atingir temperatura inferior a 40 °C.

FASE D (Compostos ativos)

Os componentes da FASE D foram pesados para elaborar 50,0 g de preparação. Os pós foram adicionados, sem prévia dispersão, um a um, sob agitação de 1000 rpm, por tempo suficiente para se adquirir aspecto homogêneo.

4.2.2 Seleção das formulações

As formulações foram mantidas em repouso por 24 horas após o preparo, com a finalidade de se completar o processo de emulsificação adquirindo assim, a consistência que foi considerada na avaliação das formulações (LANZET, 1993; RIEGER, 2001). Após esse período, as formulações foram analisadas macroscopicamente, a fim de verificar quais apresentavam características organolépticas adequadas, segundo critérios do formulador. Foram avaliadas as características de aspecto, cor e odor (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). A consistência aparente das formulações foi determinada visualmente, aplicando-se fração de massa reduzida da emulsão sobre o dorso da mão (critério do formulador).

Nesta etapa, as características acima descritas foram usadas para realizar triagem na seleção das formulações. Aquelas consideradas inadequadas para a incorporação dos compostos ativos, nas concentrações máximas, foram rejeitadas, não sendo submetidas à Avaliação Preliminar da Estabilidade.

4.2.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

As formulações aprovadas na triagem de desenvolvimento foram submetidas aos seguintes ensaios:

- teste da Centrifugação: alíquotas de 5,0 g das formulações foram pesadas em tubos de centrífuga. Procedeu-se ao teste, em réplicas de dois, utilizando-se, como condições experimentais: temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C); velocidade de rotação de 3000 rpm (210 G); e tempo de teste de 30 minutos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004);
- teste de Estresse Térmico (banho termostatzado): alíquotas de 5,0 g das formulações foram pesadas em tubos de ensaio. As amostras, em réplicas de dois, foram submetidas ao estresse térmico, em banho termostatzado, no intervalo de temperatura controlada entre 40,0 e 80,0 °C, com taxa de progressão de aumento de temperatura de 10,0 °C a cada 30 minutos. As formulações foram avaliadas ao final do teste, após atingirem a temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C).

Após os ensaios, as formulações foram analisadas quanto ao aspecto, cor e odor e classificadas como segue:

- **(IM)** para intensamente modificada;
- **(M)** para modificada;
- **(LM)** para levemente modificada;
- **(N)** para normal, sem alteração quanto ao aspecto (RIBEIRO, KHURY e GOTTARDI, 1996; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Como critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras submetidas à APE, as formulações classificadas como **normal (N)** para ambos os ensaios, **normal (N)** e **levemente modificada (LM)** ou **levemente modificada (LM)** para ambos os ensaios foram consideradas aptas para serem submetidas sequencialmente ao Teste de Estabilidade Acelerada.

4.2.4 Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

Amostras de, aproximadamente, 20,0 g de formulação foram acondicionadas em potes boca larga de polipropileno, com batoque, ocupando

cerca de 2/3 do volume total declarado do frasco (30 g) para avaliação de possíveis trocas gasosas. As formulações foram submetidas às condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Réplicas de dois foram utilizadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As amostras foram submetidas às seguintes condições controladas de armazenamento, protegidas da incidência de luz:

- **temperatura ambiente** ($22,0 \pm 2,0$ °C) por 14 dias. Análises no 1º, 3º, 7º e 14º dias;
- **temperatura baixa** (refrigerador, $5,0 \pm 2,0$ °C) por 14 dias. Análises no 3º, 7º e 14º dias;
- **freezer** ($-10,0 \pm 2,0$ °C) por 14 dias. Análises no 7º e 14º dias;
- **temperatura elevada** (estufa, $45,0 \pm 2,0$ °C) por 14 dias. Análises no 3º, 7º e 14º dias;
- **ciclos de 24 horas a $-10,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas $40,0 \pm 2,0$ °C** durante 12 dias (6 ciclos). Análises no 6º e 12º dias.

Os parâmetros avaliados foram as características:

- **organolépticas** - foram avaliadas visualmente as características de aspecto, cor e odor (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004);
- **físico-química** - dispersões a 10% p/v das preparações foram analisadas quanto ao valor de pH em água recém-destilada, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), em pHmetro (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007; USP, 2009). Réplicas de dois foram utilizadas;
- **física** - a viscosidade aparente (cP) das formulações foi determinada em viscosímetro. Alíquotas de 10,0 g das amostras foram transferidas para o compartimento de amostra reduzida. As medições foram realizadas à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), utilizando-se a agulha TR9 e velocidade de rotação de 12 ou 60 rpm. O registro do valor de viscosidade aparente foi realizado após 3 minutos de rotação. Réplicas de dois foram utilizadas.

As formulações, em sua totalidade, foram deixadas em repouso durante período de 30 minutos em temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), após retirada da sua condição de armazenamento, a fim de realizar as análises de valor de pH e viscosidade aparente em condições equilibradas de temperatura da amostra e ambiente. Todas as amostras foram avaliadas visualmente logo após a retirada da condição de armazenamento e após o período de climatização com a temperatura local.

Os critérios adotados para a aprovação ou rejeição das amostras avaliadas pelo TEA foram:

- **aspecto** - integridade das amostras mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento, exceto em temperaturas elevadas, *freezer* ou ciclos em que modificações foram aceitas;
- **cor e odor** - normais durante o armazenamento à temperatura ambiente e leves modificações foram aceitas em temperaturas elevadas;
- **valor de pH** - não se admitiu variação superior a $\pm 10\%$, comparadas com o valor inicial em todas as condições de armazenamento;
- **viscosidade aparente** - admitiram-se modificações, desde que não comprometessem a aplicação cosmética das amostras (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Ao final da etapa de desenvolvimento, que englobou a formulação de diversas bases, Avaliação Preliminar da Estabilidade e Teste de Estabilidade Acelerada, foi selecionada uma base emulsionada para atuar como veículo das combinações dos compostos ativos.

4.3 Combinação qualitativa e quantitativa (% p/p) dos compostos bioativos e ativos ¹

As combinações do óxido de zinco, do dióxido e dos compostos bioativos (rutina ou quercetina) estão descritas na **Tabela 2**.

¹ [As combinações foram incorporadas na base selecionada pelo TEA. A associação entre rutina e quercetina em uma mesma base não foi objetivo deste estudo]

Tabela 2. Associação qualitativa e quantitativa (% p/p) dos compostos ativos e bioativos

Formulações	Compostos ativos (% p/p)			
	Óxido de zinco	Dióxido de titânio	Rutina	Quercetina
F1	---	---	---	---
F2	5,0	5,0	2,5	---
F3	5,0	5,0	---	2,5
F4	5,0	5,0	5,0	---
F5	5,0	5,0	---	5,0
F6	5,0	5,0	---	---
F7	---	5,0	2,5	---
F8	---	5,0	---	2,5
F9	---	5,0	5,0	---
F10	---	5,0	---	5,0
F11	5,0	---	2,5	---
F12	5,0	---	---	2,5
F13	5,0	---	5,0	---
F14	5,0	---	---	5,0
F15	5,0	---	---	---
F16	---	5,0	---	---
F17	---	---	2,5	---
F18	---	---	5,0	---
F19	---	---	---	2,5
F20	---	---	---	5,0

Legenda: ---: composto não adicionado.

4.4 Teste de Estabilidade Normal (TEN)

As formulações que apresentaram resultados satisfatórios no TEA foram submetidas ao Teste de Estabilidade Normal. Amostras de, aproximadamente, 20,0 g foram acondicionadas em potes de polipropileno, boca larga, ocupando cerca de 2/3 do volume total declarado do frasco para avaliação de possíveis trocas gasosas. Este estudo tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil estimada e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As amostras foram submetidas às seguintes condições, durante 120 dias:

- **temperatura ambiente** ($22,0 \pm 2,0$ °C), análises no 1º, 30º, 60º, 90º e 120º dias;
- **temperatura baixa** ($5,0 \pm 2,0$ °C), análises no 1º, 30º, 60º, 90º e 120º dias;
- **temperatura elevada** ($40,0 \pm 2,0$ °C), análises no 1º, 30º, 60º, 90º e 120º dias.

Os parâmetros avaliados foram as características:

- **organolépticas** (aspecto, cor e odor);
- **físico-química** (valor de pH);
- **física** (viscosidade aparente, cP);
- **funcional** (FPS e proteção anti-UVA).

4.4.1 Caracterização funcional *in vitro* das preparações: fator de proteção solar estimado e propriedades anti-UVA

Determinou-se a eficácia *in vitro* das preparações em espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000-S) por meio da obtenção dos parâmetros a seguir: fator de proteção solar estimado (FPS), comprimento de onda crítico (λ_c), razão UVA/UVB e absorbância.

Neste método, a transmitância hemisférica total é medida em esfera de integração, que coleta a luz dispersada em todos os ângulos, conforme esquematizado na **Figura 6** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Figura 6. Geometria difusa/normal ($d/0^\circ$). Adaptação de Springsteen e colaboradores, 1999

Utilizaram-se, como substrato sintético, placas comerciais de Polimetil Metacrilato (PMMA), Helioplate[®]. Alíquotas de 50,0 mg das amostras foram aplicadas uniformemente sobre o substrato, na forma de filme fino, em movimentos circulares sobre a superfície da placa. Os registros dos valores espectrofotométricos da transmitância foram realizados em intervalo de comprimento de onda entre 250 e 450 nm, na taxa de progressão de 1 nm. Leituras em duplicata foram empregadas com repetições de cinco leituras por réplica (DIFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2008a). Os valores dos parâmetros da funcionalidade estimada das amostras foram calculados pelo programa do equipamento de espectrofotometria de refletância (Labsphere[®] UV-2000 *Application* Versão: 1.1.1.0).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento das formulações

O desenvolvimento das formulações abrangeu a elaboração de 15 preparações em veículos emulsionados do tipo O/A, com a finalidade de obtenção de emulsões macroscopicamente estáveis, com consistência aparente variada e de características organolépticas (aspecto, cor e odor) aceitáveis, segundo critérios do formulador.

5.1.1 Preparo das formulações

As formulações da etapa do desenvolvimento foram nomeadas como **D1** a **D15**. O objetivo da etapa foi selecionar a base emulsionada mais adequada para a posterior incorporação dos compostos ativos. Algumas formulações não foram incorporadas de compostos ativos (**D1**, **D2**, **D6**, **D8**, **D10**, **D11**, **D12** e **D13**), enquanto outras os receberam nas suas concentrações máximas com o intuito de se realizar avaliação visual do comportamento das bases autoemulsionantes frente à incorporação dos flavonoides e filtros solares físicos.

5.1.2 Seleção das formulações

Após o repouso de 24 horas, as formulações foram analisadas macroscopicamente. O **Quadro 3** descreve a caracterização organoléptica das preparações.

Quadro 3. Características organolépticas (aspecto, cor e odor) das formulações após 24 horas do preparo

Formulação	Aspecto	Cor	Odor
D1	Homogênea, consistência aparente elevada	Branca	Característico
D2	Homogênea, consistência aparente elevada	Branca	Característico
D3	Heterogênea, sinais de ressecamento aparente	Amarela	Característico
D4	Incompatível com a proporção de compostos ativos incorporados	Amarela	Característico
D5	Homogênea, consistência aparente elevada	Amarela	Característico
D6	Heterogênea	Amarelo-clara	Característico
D7	Heterogênea	Amarela	Característico
D8	Heterogênea	Amarelo-clara	Característico
D9	Heterogênea	Amarela	Característico
D10	Homogênea, loção fluida	Branca	Característico
D11	Homogênea, loção fluida	Branca	Característico
D12	Homogênea, loção fluida	Branca	Característico
D13	Homogênea, loção fluida	Branca	Característico
D14	Homogênea, consistência aparente elevada	Amarela	Característico
D15	Homogênea, consistência aparente elevada	Amarela	Característico

As formulações **D1** e **D2**, ausentes de compostos ativos, foram rejeitadas na etapa de desenvolvimento por apresentarem elevada consistência aparente, o que dificulta ou inviabiliza a incorporação dos compostos ativos. As formulações **D3** (5,0% p/p de rutina), **D4** (5,0% p/p de rutina; 5,0% p/p de quercetina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio) e **D5** (5,0% p/p de rutina; 5,0% p/p de quercetina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio) não favoreceram a adequada dispersão dos compostos ativos no estado físico pó. Adicionalmente, **D3** e **D4** se apresentaram visualmente ressecadas (com presença de “rachaduras” na superfície) após o período de 24 horas do repouso.

As formulações **D6** (ausente de compostos ativos), **D7** (3,0% p/p de rutina; 3,0% p/p de quercetina; 3,0% p/p de óxido de zinco; e 3,0% p/p de dióxido de titânio), **D8** (ausente de compostos ativos) e **D9** (5,0% p/p de rutina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio) apresentaram-se homogêneas imediatamente após o preparo (**Figura 7 A**), no entanto, sinais de incompatibilidade foram observados, resultando em aspecto heterogêneo após 24 horas da manipulação, conforme ilustrado na **Figura 7 B**. A incompatibilidade observada, provavelmente, foi provocada pela adição da mistura de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) e manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), pois as formulações não adicionadas dessas substâncias graxas de origem vegetal se mantiveram aparentemente estáveis, com aspecto íntegro após o período de repouso.

Figura 7. Aspecto da formulação **D6** após o preparo (**A**) e após 24 horas de repouso (**B**)

As formulações **D10**, **D11**, **D12** e **D13** (ausentes de compostos ativos ou bioativos) obtiveram desempenho superior quando comparadas com as demais, pois apresentaram consistência mais fluida, o que as tornou experimentalmente mais adequadas para a incorporação dos compostos ativos e com melhor perfil de aplicação sobre a pele, segundo critérios do formulador.

As preparações **D14** e **D15**, ambas contendo as associações de compostos ativos de 5,0% p/p de rutina, 5,0% p/p de óxido de zinco e 5,0% p/p de dióxido de titânio, foram consideradas aptas para os ensaios subsequentes na presente pesquisa, pois a elevada consistência aparente foi adquirida somente após a incorporação da proporção de 15,0% p/p de compostos ativos na forma física de pó (5,0% p/p de rutina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio).

Mediante o exposto, as formulações **D10**, **D11**, **D12**, **D13**, **D14** e **D15** foram selecionadas para a Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE).

5.1.3 Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE)

As formulações selecionadas na etapa do desenvolvimento foram submetidas à APE. O **Quadro 4** descreve os resultados do Teste de Centrifugação e do Estresse Térmico.

Quadro 4. Avaliação Preliminar da Estabilidade (Teste da centrifugação e do estresse térmico)

Formulação	Teste de centrifugação	Teste de estresse térmico
D10	LM	M
D11	LM	M
D12	N	N
D13	LM	LM
D14	LM	N
D15	N	N

Legenda: N: Normal; LM: Levemente modificada; M: Modificada.

Durante os testes de centrifugação e estresse térmico, certa separação de fases foi considerada como modificação leve (**LM**), pois tal comportamento foi esperado mediante a condição de estresse imposta pelos testes da APE. As formulações foram consideradas modificadas (**M**) quando houve, além da separação de fases, perda de outros parâmetros, tais como: consistência aparente e/ou modificação das características organolépticas.

As formulações **D10** e **D11** apresentaram separação de fases no teste de centrifugação, mas somente foram reprovadas após a observação das modificações severas depois do teste de estresse térmico, que envolveram separação de fases concomitante com a perda de consistência aparente.

De acordo com a **Figura 8**, observou-se que houve separação de fases na formulação **D13**. Entretanto, a incorporação dos compostos ativos na forma física de pó (**D15**) contribuiu para a estabilidade da formulação, reduzindo o aspecto heterogêneo observado na formulação **D13**.

Figura 8. Aspecto das formulações **D12**, **D13**, **D14** e **D15** após o teste da centrifugação

De acordo com os critérios adotados na APE, as formulações **D12**, **D13**, **D14** e **D15** apresentaram desempenho satisfatório e foram submetidas ao Teste de Estabilidade Acelerada.

5.1.4 Teste de Estabilidade Acelerada (TEA)

De acordo com a Legislação Brasileira vigente, o Estudo de Estabilidade Acelerada se utiliza de condições extremas de temperatura com a finalidade de acelerar possíveis reações de degradação química e modificações físicas de substâncias e/ou alterações na forma farmacêutica ou cosmética e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Tabela 3. Teste de Estabilidade Acelerada da formulação **D12**: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp)

D12		Condições de armazenamento												
		Ambiente			Temperatura Baixa			Temperatura Elevada			Ciclos		Freezer	
		22,0 ± 2,0 °C			5,0 ± 2,0 °C			45,0 ± 2,0 °C			-10,0/+ 40,0 ± 2,0 °C		-10,0 ± 2,0 °C	
		tempo (dias)												
Variáveis	t0	3º	7º	14º	3º	7º	14º	3º	7º	14º	6º	12º	7º	14º
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	N	M	LM	LM	LM	M
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Valor de pH	4,8	5,0	4,9	5,0	4,4	4,9	5,0	4,8	4,7	5,1	5,2	5,0	4,6	4,8
σ	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,4
% variação	-	4,2%	2,1%	4,2%	-8,3%	2,1%	4,2%	0,0%	-2,1%	6,2%	8,3%	4,2%	-4,2%	0,0%
Viscosidade (cP)	2700	2550	3200	3300	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2600	3850	NA	NA
σ	0	71	141	141	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	71	NA	NA
% variação	-	-8,9%	14,3%	17,9%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-7,1%	37,5%	NA	NA

Legenda: Parâmetros utilizados no teste de Viscosidade: Equipamento viscosímetro Visco Star R Fungilab, agulha TR9 e velocidade de rotação de 60 rpm

NA: Não foi possível avaliar estes pontos, pois o equipamento não registrou valores confiáveis utilizando os parâmetros estabelecidos.

σ: Desvio Padrão

Composição qualitativa da formulação **D12**: *Cetearyl alcohol (and) PEG-20 Stearate; Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol, Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer; BHT; Glycerin; Sorbitol; Disodium EDTA; Aqua; Cyclopentasiloxane; Imidazolidinyl Ureia; Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Phenoxyethanol (and) Propylparaben.*

Tabela 4. Teste de Estabilidade Acelerada da formulação **D13**: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp)

D13		Condições de armazenamento												
		Ambiente			Temperatura Baixa			Temperatura Elevada			Ciclos		Freezer	
		22,0 ± 2,0 °C			5,0 ± 2,0 °C			45,0 ± 2,0 °C			-10,0/+ 40,0 ± 2,0 °C		-10,0 ± 2,0 °C	
		tempo (dias)												
Variáveis	t0	3º	7º	14º	3º	7º	14º	3º	7º	14º	6º	12º	7º	14º
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	LM	LM	LM	LM	LM	N	N
Cor	Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Valor de pH	4,6	4,6	4,5	4,7	4,2	4,4	4,6	5,0	4,5	4,6	4,8	4,8	4,4	4,6
σ	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
% variação	-	0,0%	-2,2%	2,2%	-8,7%	4,3%	0,0%	8,7%	-2,2%	0,0%	4,3%	4,3%	-4,3%	0,0%
Viscosidade (cP)	2700	3100	3550	3800	2700	2850	3550	200	100	150	350	400	805	600
σ	141	0	71	0	0	71	71	0	71	71	71	0	7	0
% variação	-	14,8%	31,5%	40,7%	0,0%	5,6%	31,5%	-92,6%	-96,3%	-94,4%	-87,0%	-85,2%	-70,2%	-77,8%

Legenda: Parâmetros utilizados no teste de Viscosidade: Equipamento viscosímetro Visco Star R Fungilab, agulha TR9 e velocidade de rotação de 60 rpm

NA: Não foi possível avaliar estes pontos, pois o equipamento não registrou valores confiáveis utilizando os parâmetros estabelecidos.

σ: Desvio Padrão

Composição qualitativa da formulação **D13**: *Cetearyl Alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-2 Stearate (and) Stearic Acid (and) Ceteth-10 (and) Polysorbate 60 (and) Theobroma grandiflorum seed butter (and) Helianthus annuus seed oil (and) Cetyl Palmitate; Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol, Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer; BHT; Glycerin; Sorbitol; Disodium EDTA; Aqua; Cyclopentasiloxane; Imidazolidinyl Ureia; Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Phenoxyethanol (and) Propylparaben.*

Tabela 5. Teste de Estabilidade Acelerada da formulação **D14**: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp)

D14		Condições de armazenamento												
		Ambiente			Temperatura Baixa			Temperatura Elevada			Ciclos		Freezer	
		22,0 ± 2,0 °C			5,0 ± 2,0 °C			45,0 ± 2,0 °C			-10,0/+ 40,0 ± 2,0 °C		-10,0 ± 2,0 °C	
		tempo (dias)												
Variáveis	t0	3º	7º	14º	3º	7º	14º	3º	7º	14º	6º	12º	7º	14º
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	LM	LM	M	M	M	N	LM
Cor	Amarela	N	N	N	N	N	N	N	M	M	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Valor de pH	7,2	7,0	7,2	7,2	6,7	7,2	7,2	6,7	6,8	7,2	6,7	7,2	7,0	7,4
σ	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,4	0,2	0,4	0,1	0,1	0,0
% variação	-	-2,8%	0,0%	0,0%	-7,0%	0,0%	0,0%	-7,0%	-5,6%	0,0%	-7,0%	0,0%	-2,8%	2,8%
Viscosidade (cP)	16350	17350	15500	16600	15850	15450	18050	21650	19500	NA	16350	16150	14550	13100
σ	212	71	283	1273	778	71	919	1202	283	NA	1485	1061	212	141
% variação	-	6,1%	-5,2%	1,5%	-3,1%	-5,5%	10,4%	32,4%	19,3%	NA	0,0%	-1,2%	-11,0%	-19,9%

Legenda: Parâmetros utilizados no teste de Viscosidade: Equipamento viscosímetro Visco Star R Fungilab, agulha TR9 e velocidade de rotação de 60 rpm

NA: Não foi possível avaliar estes pontos, pois o equipamento não registrou valores confiáveis utilizando os parâmetros estabelecidos.

σ: Desvio Padrão

Composição qualitativa da formulação **D14**: *Cetearyl alcohol (and) PEG-20 Stearate; Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol, Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer; BHT; Glycerin; Sorbitol; Disodium EDTA; Aqua; Cyclopentasiloxane; Imidazolidinyl Ureia; Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Phenoxyethanol (and) Propylparaben; Rutin; Zinc oxide; Titanium dioxide.*

Tabela 6. Teste de Estabilidade Acelerada da formulação **D15**: determinação das propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente (cp)

D15		Condições de armazenamento												
		Ambiente			Temperatura Baixa			Temperatura Elevada			Ciclos		Freezer	
		22,0 ± 2,0 °C			5,0 ± 2,0 °C			45,0 ± 2,0 °C			-10,0/+ 40,0 ± 2,0 °C		-10,0 ± 2,0 °C	
		tempo (dias)												
Variáveis	t0	3º	7º	14º	3º	7º	14º	3º	7º	14º	6º	12º	7º	14º
Aspecto	Homogêneo	N	N	N	N	N	N	N	LM	M	N	N	N	N
Cor	Amarela	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	Característico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Valor de pH	7,3	6,8	7,2	7,2	6,7	7,0	7,1	6,5	6,7	7,1	6,6	7,3	6,7	7,2
σ	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
% variação	-	-6,8%	-1,4%	-1,4%	-8,2%	-4,1%	-2,7%	-11,0%	-8,2%	-2,7%	-9,6%	0,0%	-8,2%	-1,4%
Viscosidade (cP)	2800	9400	NA	NA	8750	NA	NA	NA	NA	NA	2600	5450	900	900
σ	0	141	NA	NA	71	NA	NA	NA	NA	NA	141	71	0	0
% variação	-	235,7%	NA	NA	212,5%	NA	NA	NA	NA	NA	-7,1%	94,6%	-67,8%	-67,8%

Legenda: Parâmetros utilizados no teste de Viscosidade: Equipamento viscosímetro Visco Star R Fungilab, agulha TR9 e velocidade de rotação de 60 rpm

NA: Não foi possível avaliar estes pontos, pois o equipamento não registrou valores confiáveis utilizando os parâmetros estabelecidos.

σ: Desvio Padrão

Composição qualitativa da formulação **D15**: *Cetearyl Alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-2 Stearate (and) Stearic Acid (and) Ceteth-10 (and) Polysorbate 60 (and) Theobroma grandiflorum seed butter (and) Helianthus annuus seed oil (and) Cetyl Palmitate; Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol (and) Oleyl Alcohol; Cyclopentasiloxane (and) Dimethicone Crosspolymer; BHT; Glycerin; Sorbitol; Disodium EDTA; Aqua; Cyclopentasiloxane; Imidazolidinyl Ureia; Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Methylparaben (and) Phenoxyethanol (and) Propylparaben; Rutin; Zinc oxide; Titanium dioxide.*

As formulações, em sua totalidade, mantiveram estabilidade satisfatória nas condições de temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C) para as propriedades organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente, não resultando em alterações consideradas de extrema relevância dos parâmetros avaliados.

As **Figuras 9, 10, 11 e 12** ilustram as variações no valor de pH nas condições de temperatura ambiente, elevada e baixa para as formulações **D12, D13, D14 e D15**.

Figura 9. Variação do valor de pH na formulação **D12**. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0$ °C)

Figura 10. Variação do valor de pH na formulação D13. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0$ °C)

Figura 11. Variação do valor de pH na formulação D14. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0$ °C)

Figura 12. Variação do valor de pH na formulação **D15**. Temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura baixa ($45,0 \pm 2,0$ °C)

Constatou-se que a variação no valor de pH foi inferior a 15% nas condições descritas e, portanto, os resultados foram considerados satisfatórios.

Verificou-se influência negativa das condições de armazenamento em temperatura elevada sobre o aspecto e viscosidade aparente das preparações (ZAGUE *et al.*, 2007), como segue: nas formulações contendo Dermabase® vegetal (**D13** e **D15**), houve desestabilização dos sistemas com perda de viscosidade aparente de 2700 ± 141 cP (valor inicial) para 150 ± 71 cP (valor após 14 dias na condição de temperatura elevada). Entretanto, a incorporação dos pós, como dispersão, contribuiu para a estabilidade, conferindo resistência à perda do valor desse parâmetro, com manutenção do aspecto homogêneo da formulação (FRELICHOWSKA, BOLZINGER & CHEVALIER, 2010).

Nas formulações contendo Polawax® (**D12** e **D14**), a temperatura elevada provocou alteração do aspecto (aparente ressecamento, com a presença de rachaduras na superfície), o que foi agravado nas formulações adicionadas dos compostos ativos (rutina, óxido de zinco e dióxido de titânio). Houve a percepção de aspecto ressecado e elevação da viscosidade das formulações nessa condição. O aquecimento, em função dos dias de armazenamento, também favoreceu o escurecimento da preparação, que pode ser consequência das alterações do flavonoide, como, por exemplo, oxidação e

formação de complexos (BABY, 2005). A alteração de cor nas condições de alta temperatura, também, foi observada na formulação contendo Dermabase[®] vegetal, conforme apresentado na **Figura 12**.

Figura 13. Aspecto das formulações Polawax[®] (D14) e Dermabase[®] vegetal (D15) após 14 dias na condição de temperatura elevada ($45,0 \pm 2,0$ °C)

No *freezer*, a formulação contendo Polawax[®] (D12), sem a adição dos compostos ativos, se desestabilizou, apresentando aspecto modificado e início de separação de fases. Devido à condição, logo após a retirada para análise, observou-se fração da amostra congelada na superfície do produto. Na **Figura 14**, ilustra-se o aspecto da formulação, após equilíbrio de temperatura com o ambiente. O congelamento da água pode ter levado à desestruturação do sistema de micelas presente no veículo emulsionado, provocando separação de fases, evidenciado pela presença de água na superfície (BABY, 2005). O congelamento da fase aquosa leva à formação de cristais de gelo que exercem pressões anômalas sobre as gotículas dispersas e sobre a camada de emulsionante adsorvida. Além disso, pode haver concentração de eletrólitos dissolvidos na água não congelada, afetando a densidade de carga das gotículas o que agrava a modificação estrutural nas micelas. Ainda, alguns emulsionantes também podem precipitar em baixas temperaturas (AULTON, 2005). Tal resultado é corroborado com Chen e He (2003) que descreveram, sucintamente, o fenômeno envolvido no processo do congelamento e descongelamento de sistemas emulsionados. Em uma emulsão, o filme na interface óleo-água e a distribuição dos tensoativos nele apreciam papel de importância singular para a estabilidade do produto. Quando a temperatura é

reduzida e a água se congela, moléculas dos tensoativos são expelidas da matriz de gelo e, conseqüentemente, da interface. Após período de tempo suficiente, as moléculas dos tensoativos expelidas difundem para a fase aquosa. Quando a temperatura é elevada durante o descongelamento, mais moléculas dos tensoativos serão difundidas da matriz, pois o filme da interface será descongelado primeiro, promovendo assim, a desestabilização do sistema emulsionado, com visível separação de fases (CHEN & HE, 2003).

Figura 14. Aspecto da formulação **D12** após 14 dias na condição de freezer ($-10,0 \pm 2,0$ °C)

De acordo com os resultados do TEA, a base selecionada para as demais etapas da presente pesquisa foi a Dermabase[®] vegetal (**D13**), mais fluida e, conseqüentemente, com probabilidade superior de melhor perfil de espalhamento após a incorporação dos compostos ativos.

5.2 Teste de Estabilidade Normal (TEN)

5.2.1 Base emulsionada sem compostos ativos (F1)

A formulação **F1** (antes denominada de **D13**) não possuiu compostos ativos incorporados, tendo sido utilizada, durante o período do TEN, como

parâmetro controle para avaliar o comportamento da emulsão base. De acordo com os dados da **Tabela 7**, verificou-se que a emulsão base apresentou estabilidade adequada, com manutenção do seu aspecto homogêneo, sem alterações das características organolépticas (aspecto, cor e odor). O valor de pH da emulsão base se manteve estável, não ocorrendo variação superior a 15% em relação ao valor inicial em nenhuma das condições estudadas.

Tabela 7. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F1**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F1	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1
λ_c	386	359	373	362	370	375	378	377	378	376	376	371	377
pH médio	4,73	4,48	4,90	4,83	4,87	4,54	4,84	4,57	4,87	4,63	4,56	4,74	4,84
Viscosidade aparente	10550	17300	21100	19800	21650	10700	10400	10250	8600	21100	24050	25150	25950

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial;
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância;
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância;
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

O valor de viscosidade aparente apresentou tendência de aumento em relação ao valor inicial nas condições de temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0$ °C) e temperatura elevada ($40,0 \pm 2,0$ °C). Apesar do valor da viscosidade aparente ter apreciado variações, esta característica não influenciou no perfil de aplicação do produto sobre a pele, segundo critérios do formulador. Em condição de baixa temperatura, a viscosidade aparente se manteve estável, com tendência de queda no 120º dia de análise.

Ensaio *in vitro* apresentam importância relevante na caracterização funcional, na predição da segurança e na elucidação do potencial de uso de componentes ativos diversos empregados em produtos cosméticos, ou mesmo as preparações dermocosméticas propriamente ditas, devido à conveniência experimental, custo e tempo de realização relativamente reduzidos, reprodutibilidade adequada e execução facilitada (MAIA CAMPOS *et al.*, 2006; VELASCO *et al.*, 2008a). O FPS da emulsão base foi, aproximadamente, 1,0 e os parâmetros de proteção anti-UV não geraram valores considerados efetivos. Ao avaliar o espectro da absorbância das replicatas (**Figura 15**), verificou-se valor próximo à zero ao longo do espectro ultravioleta (290 a 400 nm), ou seja, não houve absorção/reflexão significativa da radiação e, conseqüentemente, não apresentou perfil fotoprotetor adequado. O valor de FPS 1,0 representa limitação do método espectrofotométrico utilizado.

Figura 15. Espectro médio de absorbância da formulação F1

5.2.2 Formulações contendo todos os compostos ativos (F2, F3, F4 e F5)

As formulações **F2**, **F3**, **F4** e **F5**, contendo associações de todos os compostos ativos (flavonoides, dióxido de titânio e óxido de zinco) desenvolveram aspectos considerados pouco adequados, evidenciado pela coloração do produto final. Após a manipulação, as formulações com quercetina apresentaram intensa coloração amarelada, enquanto as formulações contendo rutina, apresentaram coloração esverdeada. Quando aplicadas sobre a pele, a coloração original das formulações persistia, cobrindo a superfície e resultando em produto cosmético de atratividade e competitividade dificultada. O teste de aparência após aplicação sobre a pele foi realizado pelo formulador para avaliar a possibilidade de aceitação dessas formulações.

Com relação ao aspecto, observou-se o escurecimento das formulações contendo rutina associada aos filtros físicos dióxido de titânio e óxido de zinco (**F2** e **F4**), conforme apresentado nas **Tabelas 8** e **10**. A modificação ocorreu do aspecto inicial esverdeado para amarelado nas seguintes condições: temperatura ambiente a partir do 30º dia e temperatura baixa a partir do 90º dia. Em temperatura elevada, a emulsão apresentou aspecto amarelado a partir do 30º dia e foi intensificando a coloração gradualmente até apresentar-se castanha no 120º dia. Nesses casos, o aspecto modificado pode ter influenciado no aumento do valor de FPS.

Nas formulações contendo quercetina associada aos filtros físicos dióxido de titânio e óxido de zinco (**F3** e **F5**), durante o período do TEN, observou-se intenso escurecimento das formulações. Tal escurecimento ocorreu, perceptivelmente, logo após o 30º dia de análise, em todas as condições, conforme apresentado na **Figura 16**.

Legenda: F3 = 5,0% de dióxido de titânio, 5,0% de óxido de zinco e 2,5% de quercetina;
F5 = 5,0% de dióxido de titânio, 5,0% de óxido de zinco e 5,0% de quercetina.

Figura 16. Aspecto das formulações **F3** e **F5** no 30º dia do Teste de Estabilidade Normal

A seguir, as **Tabelas 8, 9, 10 e 11** descrevem os resultados obtidos, respectivamente, para as formulações **F2, F3, F4 e F5**.

Tabela 8. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F2**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F2	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	M	M	M	M	N	N	M	M	M	M	M	M
FPS médio	26,6±4,2	N/A	N/A	N/A	N/A	28,7±3,1	28,0±4,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	384	N/A	N/A	N/A	N/A	385	385	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	7,10	6,99	7,74	7,46	7,16	7,23	7,15	7,52	7,38	6,95	6,74	7,45	7,45
Viscosida de aparente	27000	36300	38000	41600	41300	26700	24100	20900	20000	38400	35900	N.A.	N.A.

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de rutina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 9. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F3**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F3	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
FPS médio	22,5±7,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	385	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	6,97	7,03	6,99	7,48	7,23	6,95	7,07	7,50	7,28	6,98	6,96	7,46	7,34
Viscosida de aparente	12400	20600	22000	25800	31900	10100	9300	8800	8800	23100	25200	32200	N.A.

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de quercetina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 10. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F4**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F4	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	M	M	M	M	N	N	M	M	M	M	M	M
FPS médio	43,9±5,7	N/A	N/A	N/A	N/A	39,2±4,9	40,8±9,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	386	N/A	N/A	N/A	N/A	386	386	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	6,91	6,94	7,23	7,35	7,31	7,08	7,42	7,44	7,45	6,76	7,28	7,29	7,21
Viscosida de aparente	31900	32200	35100	N.A.	N.A.	24600	21000	19400	18200	33900	36500	N.A.	N.A.

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de rutina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 11. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F5**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F5	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
FPS médio	45,3±9,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	385	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	6,99	6,77	7,10	6,93	7,44	6,81	7,01	6,84	7,48	6,33	6,98	6,84	7,46
Viscosida de aparente	30900	35200	33700	38800	N.A.	20800	23800	22700	14800	33900	38900	41900	N.A.

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial..

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de quercetina; 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Observou-se que a porcentagem dos pós na formulação contribuiu para a viscosidade aparente inicial mais elevada e, ainda, pode ter colaborado na elevação desse parâmetro ao longo do período do TEN nas condições de temperatura ambiente e elevada. No caso da formulação **F1**, houve aumento gradual da viscosidade aparente ao longo do tempo de armazenamento, porém, menos acentuado do que o observado nessas formulações. O aumento da viscosidade aparente foi considerado influência negativa na percepção do sensorial do produto (segundo critérios do formulador), pois dificultou a espalhabilidade da formulação sobre a pele (observado já no início do estudo), e na caracterização funcional, uma vez que o filme formado sobre o substrato (placa de PMMA) foi irregular, comprometendo a obtenção dos parâmetros funcionais mais adequados durante a determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro*. Da mesma forma, a dificuldade de espalhamento da formulação sobre a pele comprometerá a eficácia fotoprotetora *in vivo*.

Na condição de baixa temperatura, a viscosidade aparente apresentou queda ao longo do estudo, o que foi identificado como característica própria da emulsão base, mas que pode ter sido agravada por incorporação de umidade à formulação em função da permeabilidade do material de acondicionamento. Para que sejam capazes de estabilizar a emulsão, os pós dispersos devem ser, de preferência, molhados em uma das fases da emulsão e possuírem entre si adesão suficiente para formar um filme que cerca as gotículas dispersas. Além disso, deve ter massa baixa o suficiente para que as forças gravitacionais não afetem o equilíbrio. Por isso, pode ter havido a formação de aglomerados dos pós dispersos na formulação, o que pode contribuir com a desestabilização do sistema emulsionado, interferindo negativamente com a eficácia antissolar (AULTON, 2005).

O aspecto escurecido, associado às alterações na viscosidade aparente, dificultaram a caracterização funcional, pois a formação do filme sobre o substrato foi irregular, o que impediu a adequada passagem do feixe da radiação UV gerada pelo equipamento, fazendo com que as medidas do FPS e comprimento de onda crítico apresentassem coeficientes de variação muito altos entre as leituras de cada réplica, estando entre 15% e 20%. Tal valor foi considerado alto, quando comparado com as formulações base (**F1**) e as

incorporadas apenas de óxido de zinco (**F15**) ou dióxido de titânio (**F16**). Devido às condições das amostras, em função do envelhecimento e do armazenamento, não se considerou a alteração do valor do FPS como modificação da eficácia estimada e sim, como um resultado falho e de baixa confiabilidade. Diante disso, em função da modificação do aspecto, as amostras foram consideradas inaptas, assim, não se registrando os valores dos parâmetros da eficácia fotoprotetora *in vitro*. Foi possível observar alteração do perfil espectral de absorção nas formulações escurecidas, indicando que interações entre os compostos ativos, que modificaram as características originais da formulação.

A **Figura 17** ilustra a absorbância da formulação **F3** nas condições inicial e após 30 dias em temperatura elevada. Verificou-se que houve modificação do perfil geral de absorção.

Figura 17. Sobreposição dos perfis espectrais da absorbância da formulação **F3** nas condições inicial e após 30 dias em temperatura elevada

O valor de pH poderia ter influenciado na alteração de cor das formulações, no entanto, não foram observadas variações acima de 15% em relação ao valor inicial. Para a formulação **F3**, todos os valores ao longo do estudo, nas três condições de armazenamento, estavam no intervalo de valor de 5,92 a 8,02. O mesmo comportamento foi observado na formulação **F5**, estando todos os valores dentro do intervalo de valor de 5,94 a 8,04. De acordo com essa avaliação, foi permitido inferir que tal parâmetro não contribuiu de maneira significativa na modificação da cor dos produtos.

5.2.3 Combinação entre dióxido de titânio e óxido de zinco (F6)

A formulação contendo dióxido de titânio associado ao óxido de zinco (**F6**) apresentou-se estável ao longo do TEN, conforme parâmetros apresentados na **Tabela 12**. O aspecto se manteve homogêneo, sem alterações de cor e odor. Além disso, a formulação não apresentou variações dos valores médios de FPS e do pH acima de 15% em relação ao inicial, demonstrando estabilidade física e química. A viscosidade aparente apresentou perfil com o mesmo padrão de resposta da emulsão base (**F1**), com elevação em temperatura ambiente (de 23600 cP para 32600 cP após 120 dias) e em temperatura elevada (de 23600 cP para 39100 cP após 120 dias). Em temperatura baixa, a viscosidade aparente apresentou tendência de queda, de 23600 cP para 16200 cP ao final de 120 dias.

A partir dos espectros de absorção da formulação (**Figura 18**), observou-se que houve perfil de absorção satisfatório na região do UVA (de 320 a 400 nm e absorção mais efetiva na região do UVB (de 280 a 320 nm).

Figura 18. Perfil espectral da formulação **F6** (condição inicial)

Tabela 12. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F6**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F6	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	11,3±1,5	11,1±3,0	11,9±2,1	12,5±2,4	11,9±2,3	12,3±2,5	12,2±3,1	12,7±1,7	12,8±1,7	12,1±2,0	12,7±2,8	11,8±1,6	12,6±2,2
λ_c	379	376	377	378	378	378	377	379	378	378	378	379	378
pH médio	7,16	7,64	6,95	7,13	7,81	7,45	7,38	7,17	7,76	7,62	7,55	7,23	7,75
Viscosida de aparente	23600	32300	35350	34800	32600	16100	17350	16700	16200	38350	38100	40150	39100

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de óxido de zinco; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

5.2.4 Combinação entre dióxido de titânio e flavonoides (F7, F8, F9 e F10)

Nas formulações em que se associaram a quercetina e o dióxido de titânio (**F8** e **F10**) foi possível observar leve modificação da coloração (escurecimento). Para a formulação **F8** (contendo 5,0% de dióxido de titânio associado a 2,5% de quercetina), a modificação de aspecto foi observada na condição de temperatura elevada, a partir do 30º dia, sendo que a formulação passou da coloração amarelada para marrom claro. No caso da formulação **F10** (contendo 5,0% de dióxido de titânio associado a 5,0% de quercetina), com maior concentração de quercetina, a mudança na coloração foi observada na condição de temperatura ambiente a partir do 60º dia e na condição de temperatura elevada, a partir do 30º dia. Observou-se, ainda, que a coloração marrom da formulação **F10** era mais intensa que a observada na formulação **F8**. Assim, o aspecto escurecido das formulações contendo quercetina, possivelmente, foi consequência das interações entre os compostos ativos, com intensidade superior para a observada com a associação ao óxido de zinco (formulações **F3** e **F5**).

No caso das formulações onde se associou a rutina ao dióxido de titânio, também se observou modificação no aspecto. A formulação **F7** passou de coloração esverdeada a amarelada no 120º dia em temperatura ambiente e no 30º dia em temperatura elevada. Já a formulação **F9**, com maior concentração de rutina, a modificação foi observada no 60º dia em temperatura ambiente e 30º dia em temperatura elevada.

Para as formulações **F7** a **F10**, os valores de pH não sofreram alteração superior a 15% em relação aos valores iniciais, sugerindo que o valor de pH, novamente, não influenciou na coloração dessas preparações. Devido às modificações de aspecto observadas, essas formulações foram consideradas inadequadas para uso como fotoprotetor.

Mais uma vez, o valor da viscosidade aparente manteve a característica da formulação base (**F1**), apresentando aumento em temperatura ambiente e temperatura elevada, e queda em temperatura baixa. No entanto, a presença dos flavonoides na formulação pode ter formado aglomerados que dificultaram

o espalhamento da mesma sobre o substrato de PMMA e, também, na superfície da pele (segundo o formulador). Apesar da concentração de pós na formulação **F6** ser mais elevada que nas formulações **F7** e **F8**, e igual à concentração das formulações **F9** e **F10**, essa formulação não apresentou facilidade de espalhamento sobre a placa de PMMA. Infere-se, segundo o exposto, que os flavonoides desenvolveram características que dificultaram o perfil de espalhamento das formulações durante o envelhecimento dessas. Considerando o mesmo critério exposto anteriormente, os valores de eficácia fotoprotetora foram desconsiderados para as amostras que apresentaram modificação no aspecto.

Tabela 13. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F7**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F7	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverdeada	N	N	M	M	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	16,1±2,1	16,6±3,1	15,5±2,4	N/A	N/A	18,1±3,4	17,9±4,3	17,7±3,3	16,5±2,2	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	386	385	384	N/A	N/A	385	385	385	386	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	5,08	5,45	5,81	6,20	6,44	5,17	5,49	5,73	6,07	5,77	6,06	6,15	6,47
Viscosida de aparente	19200	23300	22900	26400	29100	21800	16800	9900	9600	28100	30200	33700	33200

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de rutina; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 14. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F8**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F8	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	N	N	N	N	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	12,3±2,1	13,7±1,8	17,1±2,7	25,7±5,6	27,7±4,8	18,4±7,1	22,9±4,8	25,0±4,0	26,2±3,0	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	388	388	388	387	388	388	387	388	388	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	5,43	5,85	6,12	6,30	6,67	5,65	5,73	5,79	6,25	5,86	5,85	5,77	6,07
Viscosida de aparente	23600	31000	35100	35200	34100	20600	23700	22400	20400	31800	34500	37600	31600

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de quercetina; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 15. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F9**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F9	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	N	M	M	M	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	10,2±1,5	11,1±2,5	N/A	N/A	N/A	10,8±2,2	10,2±2,2	11,3±1,5	9,4±1,0	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	384	383	N/A	N/A	N/A	383	386	384	385	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	5,42	5,87	6,15	6,34	6,37	5,45	5,83	6,00	6,01	6,36	6,57	6,53	6,44
Viscosida de aparente	19600	26400	27100	28500	25400	17900	17100	11800	13400	33400	33600	34900	31000

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de rutina; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Tabela 16. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F10**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F10	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	N	M	M	M	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	11,7±2,2	13,2±2,7	N/A	N/A	N/A	12,5±3,8	13,4±2,1	11,3±1,4	11,9±1,8	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	387	386	N/A	N/A	N/A	385	384	387	387	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	5,39	6,05	6,32	6,48	6,52	5,68	5,98	6,13	6,16	6,39	6,42	6,30	6,40
Viscosida de aparente	21200	29200	31800	29500	27100	14500	15700	12100	9700	34400	34500	33100	35300

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de quercetina; e 5,0% p/p de dióxido de titânio.

5.2.5 Combinação entre óxido de zinco e flavonoides (F11, F12, F13 e F14)

O aspecto modificado para a cor (escurecimento) foi observado, também, nas formulações **F12**, contendo 5,0% p/p de óxido de zinco e 2,5% p/p de quercetina (**Tabela 18**) e **F14**, contendo 5,0% p/p de óxido de zinco e 5,0% p/p de quercetina (**Tabela 20**). A dificuldade de espalhamento da formulação foi constatada nas formulações **F12** e **F14**.

Foi postulado por Rossiter e Makris (2000) que íons metálicos podem promover a oxidação dos flavonoides pela formação de espécies reativas de oxigênio, enquanto o escurecimento pode ocorrer devido à oxidação e interações metal-polifenol. Em função dos resultados e condições experimentais, permite-se sugerir que as formulações contendo rutina ou quercetina associadas aos filtros físicos dióxido de titânio e óxido de zinco, nas proporções (% p/p) empregadas e no estado físico dos compostos bioativos, apresentaram instabilidade, ou mesmo incompatibilidade, somente constatada no decorrer da avaliação da estabilidade normal. Ressalta-se que tal perfil de estabilidade (ou instabilidade) também pode ter sido comprometido pelo veículo (adjuvantes farmacotécnicos e suas proporções quantitativas, % p/p), condição de armazenamento e material de acondicionamento, entre outros fatores. Os compostos ativos utilizados são seguros para uso em formulações cosméticas fotoprotetoras desde que não haja reações químicas ou interações de outra natureza que alterem suas características originais (ROSSITER & MAKRIS, 2000).

Rossiter e Makris (2000) citam que as reações de complexação e oxidação dos flavonoides rutina e quercetina provocam aumento na absorbância em, aproximadamente, 420 nm (radiação visível), o que corroboraria com as modificações da cor dos produtos e de seus perfis espectrais (ROSSITER & MAKRIS, 2000).

As formulações contendo rutina (**F11**, contendo 2,5% e, **F13**, 5,0%), apresentadas nas **Tabelas 17** e **19**, o escurecimento foi menos evidente, mas pôde ser observado a partir de 60 dias nas condições de temperatura ambiente e alta temperatura, quando a emulsão tornou-se amarelada e começou a

escurecer. A condição de baixa temperatura contribuiu para a manutenção do aspecto nessas formulações, pois os flavonoides são mais sensíveis à degradação em altas temperaturas (ROSSITER & MAKRIS, 2000).

Velasco e colaboradores (2008) já haviam estudado a associação de flavonoides com filtros solares inorgânicos, obtendo resultados sinérgicos satisfatórios e não tendo observado, ao longo do estudo, sinais de incompatibilidade entre estes filtros. No entanto, a concentração da rutina foi de apenas 0,1% p/p e esta estava dissolvida no sistema emulsionado (VELASCO *et al.*, 2008).

Choquenot e colaboradores (2008) estudaram a eficácia fotoprotetora da rutina e quercetina em concentrações elevadas, associadas aos filtros dióxido de titânio e óxido de zinco, também obtendo formulações com amplo espectro e elevado valor de FPS. No entanto, não realizaram testes de estabilidade para avaliar a existência de interações entre os compostos que pudessem provocar modificações semelhantes às observadas no presente estudo (CHOQUENOT *et al.*, 2008).

Tabela 17. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F11**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F11	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	N	M	M	M	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	7,5±1,3	6,4±0,7	N/A	N/A	N/A	6,4±1,0	7,4±1,4	8,1±1,1	8,3±0,9	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	387	387	N/A	N/A	N/A	387	387	387	388	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	7,20	7,03	6,91	6,96	7,21	7,29	7,01	6,99	7,27	6,97	6,69	6,87	7,12
Viscosida de aparente	22900	26400	28500	30500	31900	22400	20500	19700	21000	28700	27400	29800	30000

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de rutina; e 5,0% p/p de óxido de zinco.

Tabela 18. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F12**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F12	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
FPS médio	7,4±0,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	389	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	7,26	6,86	6,83	6,85	7,18	7,01	6,76	6,91	7,05	6,79	6,73	6,82	7,06
Viscosida de aparente	16000	24600	26200	34000	28800	14500	14400	18900	17800	31200	37400	31300	N.A.

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP).

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de quercetina; e 5,0% p/p de óxido de zinco.

Tabela 19. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F13**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F13	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	N	M	M	M	N	N	N	N	M	M	M	M
FPS médio	11,1±1,9	11,8±1,8	N/A	N/A	N/A	11,1±1,5	12,4±2,4	12,4±1,8	12,1±2,9	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	387	387	N/A	N/A	N/A	387	388	388	388	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	6,87	6,81	6,87	7,34	7,20	6,98	7,03	7,35	7,14	6,74	6,70	7,14	7,05
Viscosida de aparente	21800	27100	31000	32500	31300	21200	19200	15300	15200	29700	30000	32700	30700

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de rutina; e 5,0% p/p de óxido de zinco.

Tabela 20. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F14**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F14	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
FPS médio	15,5±3,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
λ_c	389	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH médio	6,78	6,79	6,87	7,27	7,36	6,93	6,88	7,30	7,40	6,77	6,81	7,27	7,12
Viscosida de aparente	12800	23800	22400	24400	25200	15400	13200	10900	9600	27700	25300	37400	37600

Legenda:

Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.;

FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.

λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.

Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.

N/A=não avaliado.

Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de quercetina; e 5,0% p/p de óxido de zinco.

5.2.6 Compostos ativos isolados: comparação entre dióxido de titânio (F15) e óxido de zinco (F16)

As formulações contendo o dióxido de titânio (**F15**) e aquelas contendo o óxido de zinco (**F16**) apresentaram-se aparentemente ressecadas a partir do 90º dia em temperatura elevada, possuindo, também, aumento na viscosidade aparente, conforme descrito nas **Tabelas 21** e **22**, o que levou a uma maior dificuldade de espalhamento da formulação sobre o substrato. Houve aumento do valor de FPS nessas condições de armazenamento.

As formulações comportaram-se como as demais, mantendo o valor de pH estável (variação inferior a 15% em relação ao valor inicial), e não houve modificação de cor para as formulações **F15** e **F16**.

Tabela 21. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F15**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F15	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	5,9 ± 0,4	6,1 ± 0,6	6,1 ± 1,6	6,3 ± 1,0	6,4 ± 1,1	6,6 ± 1,2	6,2 ± 1,0	6,2 ± 1,3	5,8 ± 0,5	6,5 ± 1,4	6,9 ± 1,6	7,3 ± 0,8	7,3 ± 0,9
λ_c	377	374	374	373	375	375	377	376	379	375	376	374	378
pH médio	5,38	5,82	5,66	5,84	6,11	5,56	5,83	5,90	6,06	5,81	6,64	6,66	6,97
Viscosida de aparente	18200	23200	23550	23850	25800	16050	12150	11250	11650	30800	31150	35550	37050

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância;
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de óxido de zinco.

Tabela 22. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F16**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F16	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão Branca	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	3,1 ± 0,4	2,8 ± 0,3	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,4	2,7 ± 0,3	3,0 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,5	3,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3	3,5 ± 0,4	3,9 ± 0,4
λ_c	381	382	381	381	381	382	382	381	381	382	381	381	381
pH médio	7,58	7,20	7,40	6,82	7,58	7,28	7,57	6,92	8,04	7,13	7,18	6,77	7,43
Viscosida de aparente	20800	23550	26700	29650	29400	15450	12350	14750	11150	27450	30700	28450	29500

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de dióxido de titânio.

Ao comparar-se o perfil espectral da formulação contendo dióxido de titânio (**F15**) com aquela contendo o óxido de zinco (**F16**), conforme ilustrado na **Figura 19**, constatou-se que o dióxido de titânio obteve melhor perfil de absorção no intervalo da radiação UVB (280 a 320 nm), enquanto que o óxido de zinco apresentou melhor perfil de absorção na região UVA (320 a 400 nm). O dióxido de titânio, a 5,0% p/p, gerou proteção UVB de maior magnitude em relação ao óxido de zinco, ambos nas mesmas concentrações. Os valores de comprimento de onda crítico (λ_c) da formulação **F16** foram mais elevados, com melhor distribuição de absorção do espectro na região acima de 320 nm (BAREL, PAYE e MAIBACH, 2001).

Verificou-se que o óxido de zinco apresentou propriedade de fornecer formulações com melhor desempenho anti-UVA, com perfil de absorção constante ao longo do espectro UV. O dióxido de titânio obteve melhor desempenho na eficácia anti-UVB, resultando em formulações com valores de FPS superiores (BAREL, PAYE e MAIBACH, 2001).

Figura 19. Sobreposição dos perfis espectrais da absorbância das formulações **F15** e **F16** na condição inicial (t_0)

As formulações contendo os filtros físicos apresentaram estabilidade adequada, sem alterações de aspecto e das características organolépticas ao longo do período de estudo. Os valores de viscosidade aparente seguiram a tendência da emulsão base (**F1**), apresentando elevação nas condições de temperatura ambiente e temperatura elevada, e queda na condição de baixa temperatura.

5.2.7 Compostos ativos isolados: rutina (F17 e F18) e quercetina (F19 e F20)

As formulações contendo somente o flavonoide, como composto bioativo (**F17**, **F18**, **F19** e **F20**), apresentaram aspecto colorido, de acordo com o tipo de flavonoide usado (amarelado para quercetina e esverdeado para rutina). Entretanto, quando aplicadas sobre a pele, estas formulações apresentaram-se incapazes de colori-la, formando uma fina camada sem poder de cobertura. Tal característica foi considerada positiva para as formulações com os compostos isolados em relação às associações. As formulações contendo dióxido de titânio (**F15**) e óxido de zinco (**F16**) apresentaram leve aspecto esbranquiçado quando aplicadas sobre a pele (BAREL, PAYE e MAIBACH, 2001).

A rutina e a quercetina, ambas isoladas e na concentração de 2,5% p/p, apresentaram perfis de absorção similares ao óxido de zinco na concentração de 5,0% p/p, ou seja, possuíram capacidade absorção ao longo do espectro UV (290-400 nm), tanto na região do UVB como na região do espectro UVA, mesmo em baixa concentração, conforme ilustrado na **Figura 20**. Os valores de comprimento de onda crítico dessas formulações indicaram que essas substâncias bioativas foram adequadas para a obtenção de formulações com amplo espectro de proteção (VELASCO *et al.*, 2008).

Figura 20. Sobreposição dos perfis espectrais da absorvância das formulações **F17, F18, F19 e F20** na condição inicial (t_0)

Estão apresentados os resultados para as formulações contendo a rutina (**Tabelas 23 e 25**) e para aquelas contendo a quercetina (**Tabelas 24 e 26**).

Tabela 23. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F17**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F17	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverde- ada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
λ_c	389	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388	389
pH médio	4,46	4,22	4,50	4,57	4,70	4,30	4,46	4,54	4,71	4,15	4,38	4,41	4,51
Viscosida de aparente	14300	17600	20700	22500	23000	12200	11700	10600	5900	19400	22400	22000	20700

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de rotina.

Tabela 24. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F18**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F18	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão esverdeada	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	4,3 ± 0,5	4,0 ± 0,6	4,2 ± 0,3	4,7 ± 0,9	4,9 ± 0,7	4,0 ± 0,5	4,7 ± 0,6	4,9 ± 0,7	4,6 ± 0,8	4,4 ± 0,6	4,6 ± 0,4	5,3 ± 0,4	6,0 ± 0,9
λ_c	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388	388
pH médio	4,28	4,38	4,16	4,37	4,56	4,37	4,10	4,29	4,60	4,30	4,06	4,24	4,45
Viscosidade de aparente	13700	19400	20400	21800	22000	12500	11700	8700	7100	20500	21500	23800	24800

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de rotina.

Tabela 25. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F19**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F19	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela- da	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2
λ_c	391	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390
pH médio	4,81	4,69	4,77	4,79	4,84	4,61	4,65	4,72	4,84	4,41	4,56	4,61	4,73
Viscosida de aparente	20200	21500	20100	24200	25100	11500	11300	13500	6100	31000	27400	27500	26200

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 2,5% p/p de quercetina.

Tabela 26. Teste de Estabilidade Normal da formulação **F20**: propriedades organolépticas, valor de pH, viscosidade aparente (cp) e características funcionais *in vitro*

F20	Condição de armazenamento												
	Temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C)					Temperatura baixa (5,0 ± 2,0 °C)				Temperatura elevada (40,0 ± 2,0 °C)			
Tempo (dias)	T0	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120	T30	T60	T90	T120
Aspecto	Emulsão amarela- da	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FPS médio	5,0 ± 0,9	4,5 ± 0,5	5,5 ± 0,8	4,7 ± 0,7	5,6 ± 0,6	4,3 ± 0,5	5,1 ± 0,7	5,2 ± 0,7	5,3 ± 0,7	4,5 ± 0,6	5,6 ± 0,7	5,2 ± 0,9	5,4 ± 0,8
λ_c	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390
pH médio	4,37	4,71	4,54	4,73	4,82	4,69	4,52	4,78	4,82	4,62	4,43	4,46	4,70
Viscosida de aparente	19900	23500	21800	21700	26100	16900	13400	8500	8100	27100	29700	29900	31900

Legenda: Aspecto: N=Normal, sem modificações em relação ao aspecto inicial; M=Modificado em relação ao aspecto inicial.
 FPS médio=Média do valor de fator de proteção solar, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 λ_c =Valor do comprimento de onda crítico, obtido em espectrofotômetro de refletância.
 Viscosidade aparente medida em centipoise (cP), agulha TR10, 30 rpm.
 N/A=não avaliado.
 Composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos – 5,0% p/p de quercetina.

Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos resultados para **F1** e para as preparações contendo óxido de zinco (**F15**), dióxido de titânio (**F16**) e a combinação de ambos (**F6**), providenciou evidências de que o método empregado para a determinação da eficácia fotoprotetora foi satisfatório, pois forneceu dados considerados reprodutíveis. Portanto, as limitações identificadas no estudo se relacionaram com as amostras nas quais houveram modificações de aspecto e se deveram, exclusivamente, à natureza dessas, não comprometendo a metodologia aplicada na estimativa da eficácia fotoprotetora.

Constatou-se, na presente pesquisa, que não foi adequado utilizar os flavonoides rutina e quercetina associados aos filtros solares físicos tradicionalmente empregados pela Indústria Cosmética (dióxido de titânio e óxido de zinco) devido às interações negativas que ocorreram entre os compostos e os metais, somente identificadas ao longo do tempo de realização do Teste de Estabilidade Normal, ressaltando a relevância do acompanhamento da estabilidade funcional das amostras fotoprotetoras. No entanto, em função da eficácia estimada *in vitro* que os flavonoides apresentaram, seu uso ainda pode ser explorado como substituto alternativo aos filtros solares clássicos, somado às suas propriedades antioxidantes. Ressalta-se ainda, que tanto as formulações contendo rutina isolada, como as contendo quercetina isolada, apresentaram-se física, físico-química e funcionalmente estáveis, durante o TEN.

De acordo com a Legislação Brasileira vigente (RDC nº30, de 1 de junho de 2012), as amostras de melhor desempenho resultantes do TEN, que poderiam ser denominadas de fotoprotetoras (exceto pelo fator de proteção UVA, FPUVA), foi a preparação **F6**, pois apresentou valor de FPS estimado acima de 6 e comprimento de onda crítico (não irradiado) acima de 370 nm. As amostras **F17**, **F18**, **F19** e **F20** poderiam ser denominadas de produtos multifuncionais, já que possuíram FPS *in vitro* superior a 2, adicionalmente ao potencial antioxidante dos flavonoides (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Apesar das respostas favoráveis que os flavonoides apreciaram em determinadas amostras, inconvenientes, como, por exemplo, o aspecto proporcionado às formulações e o comprometimento da espalhabilidade do produto constatado na aplicação deste sobre o substrato, sugerirem-se que novas pesquisas poderiam ser conduzidas com a finalidade de contornar tais problemas, inclusive, realizando a comprovação da eficácia antissolar *in vivo* das preparações de melhor desempenho.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Na etapa do Desenvolvimento, após a realização da Avaliação Preliminar da Estabilidade (APE) e do Teste de Estabilidade Acelerada (TEA), a preparação composta qualitativa e quantitativamente por Dermabase[®] vegetal (10,0% p/p); BHT (0,1% p/p); glicerina (4,0% p/p); sorbitol (4,0% p/p); EDTA Na² (0,5% p/p); Dow Corning[®] 9040 Silicone Elastomer Blend (2,0% p/p); Base líquida[®] (2,0% p/p); Dow Corning[®] 245 Fluid (2,0% p/p); Germall 115[®] (0,5% p/p); Phenova[®] (0,5% p/p); e água destilada recém destilada (74,4% p/p), foi selecionada como a formulação-base (veículo) para a incorporação dos compostos bioativos (rutina ou quercetina) e ativos (filtros solares físicos dióxido de titânio e óxido de zinco), isolados e em associações.

Por meio da caracterização física, físico-química e funcional (*in vitro*), a formulação-base se apresentou com consistência aparente fluida; valor de pH levemente ácido, biocompatível com o da pele; e ausente de propriedades fotoprotetoras anti-UVB e anti-UVA.

As preparações contendo os compostos bioativos e ativos, isolados ou em associações, após o período de repouso de 24 horas, possuíram valores de pH biocompatíveis com o da pele, abrangendo o intervalo de 4,28 (**F18** – 5,0% p/p de rutina) a 7,58 (**F16** – 5,0% p/p de dióxido de titânio); aspecto de creme consistente e homogêneo com intervalo de viscosidade aparente entre 12400 (**F3** – 5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 2,5% p/p de quercetina) e 31900 cP (**F4** – 5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 5,0% p/p de rutina); eficácia fotoprotetora anti-UVB estimada na faixa de FPS de 2,1 (**F19** – 2,5% p/p de quercetina) a 45,3 (**F5** – 5,0% p/p de óxido de zinco + 5,0% p/p de dióxido de titânio + 5,0% p/p de quercetina); e amplo espectro de proteção com valor mínimo de comprimento de onda crítico (nm) igual a 377 nm (**F15** – 5,0% p/p de óxido de zinco).

Por meio do Teste de Estabilidade Normal (TEN), as preparações contendo os compostos bioativos e ativos isolados ou a associação dos filtros solares físicos, **F1** (formulação-base), **F6**, **F15**, **F16**, **F17**, **F18**, **F19** e **F20**, se mantiveram estáveis para os parâmetros de análise (aspecto, FPS,

comprimento de onda crítico, valor de pH e viscosidade aparente), nas condições de armazenamento de temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) – exceto para a viscosidade aparente que apresentou tendência de decaimento em função dos dias – e temperatura elevada ($40,0 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), pelo período de 120 dias.

As associações dos filtros solares físicos dióxido de titânio e óxido de zinco com os compostos bioativos (rutina e quercetina) se apresentaram instáveis, independente da concentração (% p/p) dos compostos e da condição de armazenamento, nas preparações **F2**, **F3**, **F4**, **F5**, **F12** e **F14**, com desenvolvimento de modificação do aspecto (cor).

As preparações **F7**, **F8** (também estável em temperatura ambiente), **F9**, **F10**, **F11** e **F13** se apresentaram estáveis somente na condição de armazenamento de temperatura baixa, durante os 120 dias do estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004. v.1, 45p. (Séries Temáticas: Qualidade, 1).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 30, de 1º de Junho de 2012**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 de junho de 2012. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/gm/113518-30.html>. Acesso em 22 jun 2012.

AHMED, A.H.; SOYER, H.P.; SUNDERS, N.; BOUKAMP, P.; ROBERTS, M.S. Non-melanoma skin cancers. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.5, n.1, p.E55-E62, 2008.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005a. p.107, 361.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Publicações. Anuário ABIHPEC. Anuário ABIHPEC 2008/2009. **Anuário 2009 ABIHPEC**. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2011/10/ANUARIO_ABIHPEC_2009_BOOK.pdf. Acesso em: 24 ago. 2011.

BABY, A.R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais**. São Paulo, 2005. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BABY, A.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; VELASCO M.V.R. UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an *in vitro* assessment. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1321-1323, 2009.

BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. **Handbook of cosmetic science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2001. p.458-459, 645-652

BRANDÃO, L.A. **Index ABC**: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2.ed. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 2000. 1 CD-ROM.

BURKE, K.E.; WEI, H. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. **Toxicology and Industrial Health**, v.25, n.4/5, p.219-224, 2009.

CHANG, N.-B.; FENG, R.; GAO, Z.; GAO, W. Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.213, p.359-368, 2010.

CHEN, G.; HE, G. Separation of water and oil from water-in-oil emulsion by freeze/thaw method. **Separation and Purification Technology**, v.32, p.83-89, 2003.

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an *in vitro* method **Journal of Natural Products**, v.71, p.1117–1118, 2008.

CHRÉTIEN, M.N.; MIGAHED, L.; SCAIANO, J.C. Protecting the protectors: reducing the biological toxicity of UV sunscreens by zeolite encapsulation. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.1606-1611, 2006.

COLLARIS, E.J.H.; FRANK, J. Photoallergic contact dermatitis caused by ultraviolet filters in different sunscreens. **International Journal of Dermatology**, v.47, n.1, p.35-37, 2008.

DIFFEY, B.L. Indices of protection from *in vitro* assay of sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens**: development, evaluation,

and regulatory aspects. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.589–600. (Cosmetic science and technology series, v.15)

DOW CORNING® 9040. Elastômero de Silicone. **Ficha de informação de produto**. Disponível em: <http://www1.dowcorning.com/content/publishedlit/27-1130-01.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2012.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007

FERREIRA, F.R.; NASCIMENTO, L.F.C. Câncer cutâneo em Taubaté (SP) – Brasil, de 2001 a 2005: um estudo de prevalência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83, n.4, p.317-322, 2008.

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

FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M.A.; CHEVALIER, Y. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.351, n.2, p.348-356, 2010.

GIOKAS, D.L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: from sunscreen to human body and the environment. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.5, p.360-374, 2007.

KOLM, I.; HOFBAUER, G.; BRAUN, R.P. Early diagnosis of skin cancer. **Therapeutische Umschau**, v.67, n.9, p.439-446, 2010.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, n.6, p.937-958, 2005.

LANZET, M. Lotions. In: DE NAVARRE, M.G. **The chemistry and manufacture of cosmetics**. 2.ed. Orlando: Continental Press, 1993. v.3, cap.24, p.379-417.

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

MADERA, P.A.; EISMAN, A.B.; SANTIAGO, S.A.; ORTEGA, S.S. Evolución de la incidencia del cáncer de piel en el período 1978–2002. **Actas Dermo Sifiliográficas**, v.101, n.1, p.39-46, 2010.

MAKRIS, D.P.; ROSSITER, J.T. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3830-3838, 2000.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.4, p.121-124, 1986.

MAVERAKIS, E.; MIYAMURA, Y.; BOWEN, M.P.; CORREA, G.; ONO, Y.; GOODARZI, H. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, v.34, n.3, p.J247-J257, 2010.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v.49, n.9, p.978-986, 2010.

PALM, M.D.; O'DONOGHUE, M.N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v.20, p.360-376, 2007.

PATHAK, M.A. Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: an update. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens**: development, evaluation, and regulatory aspects. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.59-79. (Cosmetic science and technology series, v.15).

PENNA, G. Data analysis of the Brazilian Society of Dermatology skin cancer prevention campaign, 1999 to 2005. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.6, p.533-539, 2006.

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

POPIM, R.C.; CORRENTE, J.E.; MARINO, J.A.G.; SOUZA, C.A. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.4, p.1331-1336, 2008.

RENNEKAMPFF, H.-O.; BUSCHE, M.N.; KNOBLOCH, K.; TENENHAUS, M. Is UV radiation beneficial in postburn wound healing? **Medical Hypotheses**, v.75, p.436-438, 2010.

RIBEIRO, A.M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos. In: CONGRESSO NACIONAL DE COSMETOLOGIA, 10, São Paulo, 1996. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1996. p.349-375.

RIEGER, M.M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.2, cap.17, p.855-905.

SHAATH, N.A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens**: development, evaluation, and regulatory aspects. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.3-33. (Cosmetic science and technology series, v.15).

SANTORO, M.I.R.M.; OLIVEIRA, D.A.G.C.E.; KEDOR-HACKMANN, E.M.R.; SINGH, A.K. The effect of packaging on the stability of sunscreen emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.297, n.1/2, p.197-203, 2005.

SAYRE, R.M.; DESROCHERS, D.L.; MARLOW, E. Sunscreen testing methods: *in vitro* predictions of effectiveness. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.31, p.133-143, 1980.

SCHILLING, K.; BRADFORD, B.; CASTELLI, D.; DUFOUR, E.; NASH, J.F.; PAPE, W.; SCHULTE, S.; TOOLEY, I.; BOSCH, J.V.D.; SCHELLAUF, F. Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, p.495-509, 2010.

SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**: estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da

eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo: Tecnopress, 2003. p.49-68.

SOUZA, R.J.S.P.; REZENDE, M.L.; DUARTE, E.M.; METTEDI, A.P.; CORRÊA, M.P. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo – Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.237-243, 2009.

SPRINGSTEEN, A; YUREK, R.; FRAZIER, M. CARR, K.F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v.380, p.155-164, 1999.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v.150, n.1, p.25-38, 2006.

UNITED States Pharmacopeia: USP34; The National Formulary: NF29. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011. v.2, p.xvi-xviii.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rotina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008a.

VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; HAROUTIOUNIAN FILHO, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.363, n.1/2, p.50-57, 2008b.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. New analytical methods for photoprotection effectiveness testing (*in vitro*) – a review. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.27-34, 2011.

WILLEIT, M.; SITTE, H.H.; THIERRY, N.; MICHALEK, K.; PRASCHAK-RIEDER, N.; ZILL, P.; WINKLER, D.; BRANNATH, W.; FISCHER, M.B.;

BONDY, B.; KASPER, S.; SINGER, E.A. Enhanced serotonin transporter function during depression in seasonal affective disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p.1503-1513, 2008.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid: Díaz de Santos, 1990. p.249-283.

YU, C.L.; LI, Y.; FREEDMAN, D.M.; FEARS, T.R.; KWOK, R.; CHODICK, G.; ALEXANDER, B.; KIMLIN, M.G.; KRICKER, A.; ARMSTRONG, B.K.; LINET, M.S. Assessment of lifetime cumulative sun exposure using a self-administered questionnaire: reliability of two approaches. **Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.18, n.2, p.464-471, 2009.

ZAGUE, V.; ALMEIDA SILVA, D.; BABY, A.R.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Clay facial masks: physicochemical stability at different storage temperatures. **Journal of Cosmetic Science**, v.58, p.45-51, 2007.

ANEXO A – Carta de submissão de manuscrito para periódico científico

> To: dani_aperes@hotmail.com

> Subject: [RCFBA] Agradecimento pela Submissão

> Date: Thu, 14 Jun 2012 23:26:30 -0300

> From: seerfcfar@gmail.com

>

> Daniela D'Almeida Peres,

>

> Agradecemos a submissão do seu manuscrito "In vitro Solar Protection

> Factor (SPF) of commercial sunscreens by reflectance spectrophotometry"

> para {\$Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada}.

>

> URL do Manuscrito:

> http://serv-

bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/author/submission/2444

> Login: daniperes

>

> Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email:

> rcfba@fcfar.unesp.br.

> Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de

transmitir

> ao público seu trabalho.

>

>

> {\$Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta}

> {\$Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda}

> {\$Editores}

> Prof. Dr. Cleópatra da Silva Planeta

> Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

> http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/index

> rcfba@fcfar.unesp.br

ANEXO B – Resumo/*abstract* do manuscrito submetido para periódico científico

Título do Artigo: In vitro Solar Protection Factor (SPF) of commercial sunscreens by reflectance spectrophotometry

Título do artigo (língua portuguesa): Fator de Proteção Solar (FPS) in vitro de fotoprotetores comerciais por espectrofotometria de refletância

Título resumido: FPS in vitro - fotoprotetores comerciais

Autores: Fernanda Daud Sarruf; Daniela D'Almeida Peres; Deborah de Oliveira Nishikawa; Vladi Olga Consiglieri; Telma Mary Kaneko; Maria Valéria Robles Velasco; André Rolim Baby

Filiação: Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

Abstract

Knowledge of the effects of UV radiation on human skin has increased significantly. This research focused on the application of reflectance spectrophotometry with integrated sphere (RSIS) to Sun Protection Factor (SPF) determination/estimation of commercial sunscreens oriented for child (babies and kids) use. Commercially available SPF 30 sunscreens (A, B and C) for babies, children and kids were selected to be evaluated in accordance with the next methodology: pH value measurement; rheological profile; and SPF *in vitro* quantification by RSIS. Sample A claimed to contain as UV filters: homosalate, ethylhexyl salicylate (EHS), benzophenone-3 and ethylhexyl methoxycinnamate (EHM). Sample B: zinc oxide and titanium dioxide (TD). Sample C: bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, EHS, octocrylene, EHM, and TD (and) alumina (and) simethicone. Samples A, B and C generated pH values, by indicator strips, between 7.0-8.0, 7.0-8.0 and 6.0-7.0, respectively. The pH values obtained by pHmeter were 7.8 (A), 7.4 (B) and 7.0 (C). The rheological profile identified the systems as pseudoplastic non-Newtonian semisolids with hysteresis area. The t-test ($p < 0.05$) was used to confront the claimed SPF (SPF = 30) with the estimated by RSIS. *In vitro* studies have been considered of utmost importance to the cosmetic field, since *in vitro* results may previously validate submission to *in vivo* efficacy experiments. According to our results, samples A, B and C generated SPF values statistically equals to factor claimed at the commercial sunscreens. The RSIS proved to be a convenient, fast and reproducible methodology for SPF estimation.

Keywords: sunscreens; *in vitro* SPF; rheology

Resumo

O conhecimento dos efeitos da radiação UV sobre a pele humana tem crescido significativamente. Esta pesquisa tem como objetivo a aplicação da espectrofotometria de refletância com esfera de integração (EREI) para

determinar / estimar o Fator de Proteção Solar (FPS) de fotoprotetores comerciais voltados para o uso infantil (bebês e crianças). Fotoprotetores infantis com FPS 30 (A, B e C), disponíveis comercialmente, foram selecionados para serem avaliados conforme as seguintes metodologias: valor de pH, perfil reológico, e valor de FPS *in vitro* por EREI. A amostra A alegou conter os seguintes filtros UV: *homosalate*, *ethylhexyl salicylate* (EHS), *benzophenone-3* e *ethylhexyl methoxycinnamate* (EHM). A amostra B: *zinc oxide* e *titanium dioxide* (TD). A amostra C: *bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine*, EHS, *octocrylene*, EHM, e *titanium dioxide (and) alumina (and) simethicone*. As amostras A, B e C geraram valores de pH, por fitas indicadoras, entre 7.0-8.0, 7.0-8.0 e 6.0-7.0, respectivamente. Os valores de pH obtidos por peagômetro foram 7.8 (A), 7.4 (B) e 7.0 (C). O perfil reológico identificou os sistemas como semissólidos pseudoplásticos não-Newtonianos, com área de histerese. O teste-T ($p < 0.05$) foi utilizado para confrontar o FPS alegado (FPS = 30) com o estimado por EREI. Estudos *in vitro* foram considerados de grande importância para a área cosmética, uma vez que resultados obtidos *in vitro* podem corroborar previamente a submissão aos estudos de eficácia *in vivo*. De acordo com os resultados, as amostras A, B e C geraram valores de FPS estatisticamente semelhantes ao fator alegado pelos fotoprotetores comerciais. A EREI provou ser uma metodologia conveniente, rápida e reprodutível para a avaliação estimada do FPS.

Palavras chave: fotoprotetores; FPS *in vitro*; reologia