

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Fernanda Maria Pinto Vilela

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

Outros estudos demonstraram que o uso do filtro solar promove um tempo de exposição maior das pessoas à radiação ultravioleta. As pessoas sentem-se mais protegidas devido à proteção dos filtros solares contra o eritema e por isso prolongam o tempo de exposição ao sol (AUTIER et al., 1999; GIL; KIM, 2000). No entanto, considerar o eritema como a única resposta *in vivo* à radiação UV pode não

refletir a ação protetora dos filtros solares contra as outras respostas como a imunossupressão, depleção do sistema antioxidante da pele, aumento de metaloproteinases, fotoenvelhecimento e carcinogênese.

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

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

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

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

Assim, é necessária uma melhor compreensão do comportamento físico-químico das moléculas utilizadas como filtros solares, como também são necessários estudos *in vivo* que investiguem os efeitos indutores de danos à pele por esses filtros solares expostos ou não à radiação ultravioleta.

1.1. A radiação ultravioleta e os danos à pele

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

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

A redução das defesas antioxidantes da pele devido à exposição à radiação UV já foi relatada por diversos pesquisadores. Shindo e colaboradores (1993) demonstraram que, após a irradiação de camundongos sem pêlos com a radiação UV (UVA + UVB), com a dose de 25 J/cm^2 , que corresponde a dez vezes a dose eritematosa mínima, as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase sofreram um grande decréscimo na derme e epiderme. Os antioxidantes α -tocoferol, 9-ubiquinol, 9-ubiquinona, ácido ascórbico, ácido dihidroascórbico e glutatona reduzida também sofreram decréscimos de 26-93%. Pence e Naylor (1990)

verificaram que a atividade da enzima superóxido dismutase sofreu um decréscimo significativo após 12 horas de uma única exposição de camundongos sem pêlos à radiação UVB e manteve-se suprimida por mais de 72 horas após essa exposição.

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

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

remoção inadequada dessas EROs podem levar à disfunções metabólicas e danos às macromoléculas biológicas (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999)

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

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

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

A radiação ultravioleta ativa o fator de crescimento e receptores de citocinas nas superfícies de queratinócitos e fibroblastos. Os receptores ativados estimulam

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

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

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

O principal mecanismo no qual a radiação UV causa danos ao tecido conectivo, que está associado com o fotoenvelhecimento, é via indução de MMPs. A expressão basal dessas enzimas na pele é relativamente baixa, entretanto, elas podem ser aumentadas pela radiação tanto *in vivo* quanto em cultura de células. As radiações ultravioleta UVA e UVB são indutoras da secreção e ação das gelatinases,

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

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

Para limitar a exposição à radiação solar é recomendado proteger a pele com vestimentas, não ficar exposto ao sol entre 11 e 15 horas e usar protetor solar com um fator de proteção solar (FPS) igual ou superior a 15. No entanto, o aumento do uso do protetor solar está coincidindo com o aumento da incidência do câncer de pele. Existem evidências de que o potencial nocivo é consequência da indução da reatividade química pela radiação UV dos constituintes dos protetores. Tem-se atribuído efeitos adversos aos compostos orgânicos usados nas formulações fotoprotetoras, inclusive a formação de componentes promotores do câncer (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007).

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

1.2. Filtros solares

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

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

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

energia menor em magnitude do que a energia inicialmente absorvida para causar a excitação (WOLF et al., 2001).

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

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

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

1.3. Estudo de penetração cutânea

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

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

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

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

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

No que diz respeito às propriedades de absorção e penetração cutânea das substâncias na pele, metodologias *in vitro* e *in vivo* são adequadas, no entanto, os

experimentos *in vitro* são preferidos por razões éticas e de disponibilidade. Para determinar as quantidades de substâncias capazes de penetrar na pele é utilizado o método de difusão em células de Franz que é constituído por dois compartimentos separados por um disco de pele humana ou de porco. O compartimento inferior é constituído de um fluido receptor que simula a circulação sanguínea. A substância teste é colocada sobre o disco de pele e a difusão através da pele é medida pela análise do líquido receptor e as camadas da pele são analisadas separadamente (VARVARESOU, 2006).

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

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

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

Devido à presença de proteínas e de uma camada bilipídica, a pele possui sítios lipofílicos e hidrofílicos. Para se obter uma boa penetração na pele, o

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

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

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

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

Janjua e colaboradores (2004) estudaram a permeação dos filtros orgânicos 3-benzofenona, octilmetoxicinamato, e 3-(4-metilbenzilideno) na pele e seus efeitos nas concentrações dos hormônios reprodutivos em humanos a partir de experimentos *in vivo*. Não foram observados efeitos significativos nos níveis de hormônios, mas foram detectados os três compostos no plasma e na urina, o que comprovou que ocorre a permeação desses filtros através da pele.

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JANJUA, N. R.; MOGENSEN, B.; ANDRESON, A.M.; PETERSEN, J. H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, N. E.; WULF, H. C. Systemic absorption of the sunscreens Benzophenone-3, Octyl-Methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene)Camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.123, p. 57-61, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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