

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

Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do *p*-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores

Thamires Batello Freire

Tese para obtenção de título de DOUTOR

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a M. Valéria Robles Velasco

São Paulo

2022

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

Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do *p*-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores

Thamires Batello Freire

Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção de título de Doutor

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a M. Valéria Robles Velasco

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F862i Freire, Thamires Batello
Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores / Thamires Batello Freire. - São Paulo, 2021.
162 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. fotoproteção. 2. atividade antioxidante. 3. permeação cutânea. I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles, orientador.

Thamires Batello Freire

Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do *p*-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco
Orientador/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, 17 de janeiro de 2022.

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós,
Amandio Freire (in memorian), Noemia Peralta (in memorian) e Ruth Batello (in memorian),*

*Aos meus pais,
Antonio Freire e Janete Batello,*

*Aos meus irmãos,
Patrick, Daniel e Rafael,*

*À minha cunhada,
Denise Candido*

*Aos meus sobrinhos,
Heitor e Henry,*

*Ao meu marido Lucas Ferreira Borge pelo companherismo e apoio,
Aos meus amigos e parentes mais próximos,*

*À minha orientadora Prof^a. Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco por sempre ter acreditado
em meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco.

À doutora Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto.

À doutora Cibele Rosana Ribeiro de Castro Lima pelas valiosas contribuições no exame de Qualificação.

Aos professores Dr. André Rolim Baby, Dr. Humberto Gomes Ferraz, Dr. Orlando Rodrigues Júnior, Dr.^a Marina Ishii, Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo, Dr. Felipe Rebelo Lourenço, Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini e a Dr.^a Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelas valiosas contribuições.

Aos meus colegas e amigos pelo apoio, parceria e por compartilharem este momento: Alexandra, Amanda, Ana, Andressa, Bianca, Bruna, Camila, Daniela, Diego, Domingos, Edilson, Evelin, Fabiana, Fany, Fernanda, Franciele, Franklin, Gabriela, Hannah, Ingrid, Jesus, Joyce, Katherine, Leandro, Lucas, Luciana, Lohayne, Maíra, Marina, Marjory, Megumi, Micheli, Michelle, Mirela, Nadia, Paulo, Priscila, Rafael, Rodrigo, Rosana, Simone, Soraya, Thalita, Tércio, Vinicius, Vitor.

Aos funcionários da Universidade de São Paulo: Alexandre Spitalare, Biju, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Doralice Rita de Jesus Santos, Edgar Muniz Machado Junior, Eremita Santos, David Olimpio de Lima Filho e Doralice Rita de Jesus Santos.

*A FAPESP pelo auxílio financeiro do projeto sob número de processo **2018/11073-2**.*

A CAPES pela concessão de bolsa.

A todos que colaboraram para realização deste trabalho.

Epígrafe

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz
Onde houver ódio, que eu leve o amor
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão
Onde houver discórdia, que eu leve união
Onde houver dúvida, que eu leve a fé*

*Onde houver erro, que eu leve a verdade
Onde houver desespero, que eu leve a esperança
Onde houver tristeza, que eu leve alegria
Onde houver trevas, que eu leve a luz*

*Ó mestre, fazei que eu procure mais consolar que ser consolado
Compreender que ser compreendido
Amar que ser amado
Pois é dando que se recebe
É perdoando que se é perdoado
E é morrendo que se vive
Para a vida eterna*

Oração de São Francisco

SUMÁRIO

	pg.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1. Exposição solar e câncer de pele.....	23
2.2. Fotoestabilidade.....	24
2.3. <i>Butyl Methoxydibenzoylmethane</i>	25
2.4. <i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i>	26
2.5. <i>Pele e sua atividade antioxidante</i>	27
2.6. <i>Ácido Ferúlico</i>	28
2.7. <i>Resveratrol</i>	29
2.8. <i>Técnicas de Avaliação</i>	30
2.8.1. <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	30
2.8.2. <i>Análise Térmica</i>	31
2.8.3. <i>Análise qualitativa da supressão do estado energético singleto</i>	32
2.8.4. <i>Triagem de antioxidantes como potencial fotoestabilizador (FRET)</i>	32
2.8.5. <i>Avaliação da atividade antioxidante na pele e em membrana biológica alternativa</i>	35
2.8.6. <i>Estudos de eficácia de ingredientes ativos com membrana biológica (ecdi se de pele de cobra)</i>	36
2.8.7. <i>Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)</i>	38
2.8.8. <i>Penetração e Permeação cutânea</i>	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Material	43
4.1.1. <i>Matérias-primas (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)/ Ingredients)/ Grau de pureza farmacêutico</i>	43
Outros.....	44

4.1.2. Solventes e Reagentes.....	44
Reagentes grau de pureza cromatográfico.....	44
Reagentes grau de pureza analítica (P.A.).....	44
4.1.3. Padrões de referência.....	44
4.1.4. Equipamentos e acessórios.....	45
4.2. Métodos.....	46
4.2.1. Alterações moleculares nos filtros orgânicos por ¹ H RMN.....	46
a) Preparação das amostras.....	47
4.2.2. Avaliação quantitativa das amostras por RMN quantitativo (qRMN).....	48
4.2.3. Análise Térmica.....	48
a) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	49
b) Termogravimetria (TG).....	49
4.2.4. Análise qualitativa da supressão do estado energético singlete por fluorescência.....	49
4.2.5. Triagem de antioxidantes com potencial fotoestabilizador por <i>Förster Re- sonance Energy Transfer (FRET)</i>	51
4.2.6. Desenvolvimento das formulações.....	51
4.2.7. Avaliação da Estabilidade Preliminar.....	52
a) Características Organolépticas.....	53
b) Centrifugação.....	53
c) Estresse térmico.....	53
4.2.8. Avaliação da Estabilidade Acelerada.....	53
4.2.9. Avaliação da Estabilidade Normal (AEN).....	54
a) Características Organolépticas.....	54
b) Parâmetro físico-químico - pH.....	54
c) Caracterização da Eficácia Fotoprotetora <i>in vitro</i>	54
d) Fotoestabilidade de formulações fotoprotetoras.....	55
e) Quantificação dos filtros solares (BMBM e EHMC) por qRMN nas formula- ções fotoprotetoras no decorrer da AEN.....	56
4.2.10. Atividade antiradicalar.....	56
4.2.11. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) <i>ex vivo</i>	57
a) Preparação de ecdise de pele de cobra (EC).....	57
b) Parâmetros EPR.....	58
c) Fluxograma do experimento.....	59
d) Leitura de EPR antes e após a irradiação UV.....	59
4.2.12. Validação do método bioanalítico.....	60
a) Identificação e quantificação dos filtros BMBM e EHMC na base fotoprote- tora na ausência ou na presença dos antioxidantes AF ou RES	60
b) Linearidade.....	60
c) Precisão e Exatidão.....	60
d) Limite de Quantificação (LQ).....	61
e) Limite de Detecção (LD).....	61

f) Determinação da condição <i>sink</i> e líquido receptor da mistura de filtros solares	61
g) Recuperação dos filtros solares.....	62
h) Avaliação da retenção de filtros solares no estrato córneo por <i>tape stripping</i> ...	63
i) Avaliação da retenção dos filtros solares na epiderme viável e derme.....	64
j) Seletividade: Pesquisa de interferentes.....	64
4.2.13. Avaliação da Penetração e Permeação cutânea na orelha de porco.....	65
4.2.14. Análise estatística.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1. Alterações moleculares nos filtros orgânicos avaliadas por ¹ H qRMN.....	66
5.2. Análise térmica.....	69
5.3. Análise Qualitativa da Supressão do estado de energia singlete por fluorescência.....	77
5.4. Seleção de antioxidantes como potencial fotoestabilizador por transferência de energia de ressonância Förster (FRET).....	80
5.5. Avaliação da Estabilidade Preliminar.....	81
5.5.1. Teste de centrifugação.....	81
5.5.2. Estresse térmico.....	81
5.6. Avaliação da Estabilidade Acelerada.....	82
5.7. Avaliação da Estabilidade Normal (AEN).....	82
5.8. Eficácia Fotoprotetora <i>in vitro</i> e Fotoestabilidade das formulações no decorrer da Avaliação da Estabilidade Normal (AEN).....	85
5.9. Quantificação dos filtros solares nas formulações fotoprotetoras por qRMN no decorrer da AEN.....	93
5.10. Atividade antioxidante.....	96
5.11. Medidas de EPR.....	101
5.12. Validação bioanalítica.....	106
a) Linearidade.....	106
b) Precisão e Exatidão.....	108
c) Limite de Quantificação (LQ).....	109
d) Limite de Detecção (LD).....	109
f) Determinação da condição <i>sink</i> e fluído receptor da mistura de filtros solares.....	110
g) Seletividade: pesquisa de interferentes.....	111
h) Recuperação dos filtros solares.....	113
i) Avaliação da Penetração/ Permeação na orelha de porco.....	115
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ANEXO I: Ciência CEUA/FCF orelha de porco.....	137
ANEXO II: Ciência CEUA/FCF eclise de pele de cobra.....	138
Realizações no período (congressos e artigos).....	139
1. Evento Internacional.....	139
2. Evento Nacional.....	141
3. Publicações.....	149
Ficha do aluno.....	153
Currículo Lattes.....	156

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	<i>Ferulic acid</i>
BF	Base fotoprotetora
BMBM	<i>Butyl Methoxydibenzoylmethane</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCI	Clorofórmio
CEUA	Comite de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EC	Ecdise de cobra
ECS	Estrato Córneo
EHMC	<i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i>
EPR	<i>Electron Paramagnetic Transfer</i>
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FRET	Transferência de Energia de Förster
FPS	Fator de Proteção Solar
LM	Levemente Modificado
M	Modificado
N	Normal
PA	Pró-análise
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Padrão interno
RES	<i>Resveratrol</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TG	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano
UV (A, B e C)	Ultravioleta (A, B e C)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais (enólica e cetônica) do <i>Butyl Methoxydibenzoylmethane</i> (BMBM).....	26
Figura 2. Fórmulas estruturais do <i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i> (EHMC), <i>trans</i> e <i>cis</i>	27
Figura 3. Esquema dos derivados do ácido cinâmico.....	29
Figura 4. Fórmula estrutural do ácido ferúlico.....	29
Figura 5. Fórmula estrutural do <i>trans</i> -resveratrol (a) e <i>cis</i> -resveratrol (b).....	30
Figura 6. Representação esquemática de célula de difusão vertical de Franz.....	40
Figura 7. Representação das camadas da pele. Com destaque para a localização do melanócito que se encontra na camada basal da epiderme.....	41
Figura 8. Distribuição das amostras dos filtros em solução de metanol na cromatofolha para avaliação qualitativa da supressão do estado de energia singlete pelos antioxidantes AF e RES	50
Figura 9. Local onde foi posicionado o tubo de quartzo para EPR com a amostra no equipamento e imagem do equipamento na íntegra.....	58
Figura 10. Fotos das 2 hastes do swab, 1ª fita e 14 fitas restantes do tape stripping.....	64
Figura 11. Alíquotas da epiderme viável+derme fragmentadas.....	64
Figura 12. Montagem do sistema com células de difusão de Franz.....	66
Figura 13. Espectros ¹ H RMN dos filtros BMBM e EHMC , antes e após irradiação UV.....	67
Figura 14. Espectros ¹ H RMN dos filtros BMBM e EHMC , adicionados de AF , antes e após irradiação UV dose de 13211 J.cm ⁻²	68
Figura 15. Espectros ¹ H RMN dos filtros BMBM e EHMC , adicionados de RES antes e após irradiação UV com a dose de 13211 J.cm ⁻²	69
Figura 16. Curvas TG, DTG e DSC obtidas 10 ° C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50mL min ⁻¹) da amostra <i>Butyl Methoxydibenzoylmethane</i> (BMBM) e <i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i> (EHMC).....	70
Figura 17. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a 10° C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50mL.min ⁻¹) da amostra: EHMC , AF e EHMC + AF	73
Figura 18. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a 10° C min ⁻¹ e sob atmosfera atmosfera dinâmica de N ₂ (50mL.min ⁻¹) da amostra: EHMC,RES e EHMC+RES	74
Figura 19. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a 10° C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50mL.min ⁻¹) da amostra: BMBM , RES e BMBM + RES	75
Figura 20. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a 10° C min ⁻¹ e sob atmosfera de N ₂ (50mL.min ⁻¹) da amostra: BMBM , AF e BMBM + AF	76
Figura 21. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singlete do filtro BMBM por RES	78
Figura 22. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singlete do filtro BMBM por AF	79

Figura 23. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singlete dos filtros BMBM + EHMC por RES	79
Figura 24. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singlete dos filtros BMBM + EHMC por AF	80
Figura 25: Sobreposição das curvas de absorbância e fluorescência das soluções de acetato de etila e BMBM, EHMC, AF e RES	81
Figura 26. Formulações A1 e B1 adicionadas ou não de AF e RES , após estresse térmico.....	81
Figura 27. Formulações A1 e B1 com e sem AF e RES após ciclos gela-degela..	82
Figura 28. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade das formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $20,0 \pm 2,0$ °C (A).....	88
Figura 29. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade das formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $5,0 \pm 2,0$ °C (G).....	89
Figura 30. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade de formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $45,0 \pm 2,0$ °C (E).....	90
Figura 31: Percentual de conservação dos filtros solares BMBM e EHMC por RMN quantitativo nas formulações fotoprotetoras com e sem antioxidantes.....	95
Figura 32. Curva analítica de Trolox [®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97%) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres	97
Figura 33: Inibição do radical DPPH [*] por Resveratrol e Ácido Ferúlico.....	99
Figura 34. Ecdise de pele de cobra no experimento.....	101
Figura 35. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica antes da irradiação	102
Figura 36. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica após a irradiação	103
Figura 37. Medidas de decaimento da Ressonância Paramagnética (EPR) depois de 3 dias de irradiação.....	105
Figura 38. Curva analítica de BMBM padrão de referência secundário (Teor = 98,2%), detecção a 325 nm.....	107
Figura 39. Curva analítica de EHMC padrão de referência secundário (Teor = 98,6%), detecção a 325 nm.....	108
Figura 40. Dessecção da orelha de porco para teste de permeação cutânea. Separação da cartilagem e aparagem dos pelos.....	110
Figura 41. Cromatogramas obtidos na pesquisa de interferentes, obtidos após 24 horas do teste de permeação cutânea, empregando a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.....	112
Figura 42. Célula de difusão de Franz com orelha de porco e formulações fotoprotetoras para ensaio de permeação cutânea.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Soluções avaliadas quanto a alterações moleculares frente à radiação UV	47
Tabela II. Soluções dos filtros BMBM e EHMC adicionados ou não de AF e RES	50
Tabela III. Composição quali e quantitativa das formulações fotoprotetoras para incorporação dos antioxidantes.....	52
Tabela IV. Detalhes das medidas: ecdise de pele de cobra (isolada), com base creme e com base fotoprotetora UVB/UVA (<i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i> 10,0% p/p + <i>Butyl Methoxydi-benzoylmethano</i> 5,0% p/p) aditivadas ou não com Ácido Ferúlico 1,0% p/p ou Resveratrol 3,0% p/p, antes e após a irradiação.....	59
Tabela V. Quantificação das alterações moleculares apresentadas pelos filtros BMBM e EHMC combinados ou separados, com ou sem a adição de AF ou RES , em solução de DMSO- <i>d</i> ₆ , após exposição à radiação UV.....	67
Tabela VI. Dados da análise térmica das amostras do filtro. Resultados TG e DTG: massa (%) a faixa de temperatura de pico (° C). Resultados de DSC: ΔH (J g ⁻¹), o início e as temperaturas de pico (° C)	71
Tabela VII. Dados da análise térmica dos antioxidantes isolados e da mistura de filtro filtro solar e antioxidantes. Resultados TG/ DTG: o Δm (%), a faixa de temperatura (ΔT) e a temperatura de pico (° C). Resultados de DSC: ΔH (J g ⁻¹), o início e as temperaturas de pico (° C)	72
Tabela VIII. Características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH e e percentagem de variação do valor de pH da formulação escolhida: A1 =base com filtro (BF) aditivada ou não com Resveratrol ou Ácido Ferúlico, submetidas à Avaliação da Estabilidade Normal por 90 dias.....	85
Tabela IX. Caracterização funcional (FPS <i>in vitro</i> , λ_c , razão UVA/ UVB, porcentagem porcentagem de manutenção do valor de FPS após irradiação) durante a Avaliação da da Estabilidade Normal em t ₀ (48h da preparação) e por 90 dias (t ₃₀ , t ₆₀ e t ₉₀) para as formulações fotoprotetoras adicionadas ou não de Resveratrol e Ácido Ferúlico.....	86
Tabela X. Quantificação e percentual de conservação dos filtros solares BMBM e EHMC por RMN quantitativo nas formulações fotoprotetoras com e sem antioxidantes no decorrer da <i>Avaliação da Estabilidade Normal</i>	94
Tabela XI: Equação da reta que relaciona concentração de Trolox [®] e %SRL.....	97
Tabela XII: Dados utilizados para a construção da curva analítica de Trolox [®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97%)	97
Tabela XIII. Atividade antioxidante da base fotoprotetora equivalente em concentração concentração de Trolox [®] (μM Trolox [®] / μg) da formulação fotoprotetora testada (triplicata)	98
Tabela XIV: Atividade antioxidante das soluções metanólicas com Ácido Ferúlico e Resveratrol em concentrações variadas.....	99
Tabela XV. Atividade Antioxidante da Base Fotoprotetora (BF) com ou sem os antioxidantes Ácido Ferúlico (AF) e Resveratrol (RES) por inibição do radical DPPH' (%) em concentrações equivalentes de Trolox [®] no t ₀	100

Tabela XVI. Medidas do sinal Pico-a-Pico de decaimento da Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) antes (Não irradiado – NIR) e após irradiação (dia 1 e 3)	104
Tabela XVII: Curva analítica com os padrões de referência secundários (PD) BMBM (Teor = 98,2%) e EHMC (Teor = 98,6%) ambos detecção a 325nm.....	106
Tabela XVIII: Análise de regressão da linearidade da curva analítica de BMBM padrão de referência secundário (Teor = 98,2%) e de EHMC padrão de referência secundário (Teor = 98,6%) detecção a 325 nm.....	107
Tabela XIX: Precisão e exatidão intradia e interdia, respectivamente, do líquido receptor com pele de orelha de porco, base fotoprotetora e padrões de referência secundário de BMBM (Teor = 98,2%) e EHMC (Teor = 98,6%), pós 24h de agitação e temperatura à 37 °C.....	109
Tabela XX. Determinação da Condição <i>sink</i> e fluído receptor da mistura de filtros solares em ensaio preliminar.....	111
Tabela XXI. Recuperação dos filtros solares químicos adicionados em concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), na presença de líquido receptor com base fotoprotetora e pele de orelha de porco.....	114
Tabela XXII: Concentração dos filtros solares <i>Butyl Methoxydibenzoylmethano</i> (BMBM) e <i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i> (EHMC) presente nos compartimentos do experimento. As formulações testadas foram: base fotoprotetora, base fotoprotetora com ácido ferúlico (AF) e base fotoprotetora com Resveratrol (RES).....	115

RESUMO

FREIRE, T. B. Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do *p*-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores. 2022. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Com o intuito de promover proteção de amplo espectro, na maioria dos protetores solares se associam dois ou mais filtros orgânicos, visando proteção contra a radiação UVA e UVB. A combinação da avobenzona (**BMBM**), filtro UVA, e do *p*-metoxicinamato de octila (**EHMC**), filtro UVB, é muito utilizada em formulações manipuladas e industrializadas, porém pode ocorrer alteração na absorção espectral após a exposição à radiação UV, comprometendo a eficácia fotoprotetora. Visando reduzir a instabilidade da combinação dos filtros, se adicionam agentes fotoestabilizadores. Os antioxidantes de origem natural são utilizados em medicamentos e cosméticos com diversos benefícios, tais como: ação fotoprotetora, antienvhecimento, hidratante e antipolvente. A epiderme humana possui importante efeito de barreira e capacidade antioxidante limitada, portanto estudos com a epiderme são essenciais. A ecdise de pele de cobra (EC) é composta pelo estrato córneo e fornece uma barreira similar ao estrato córneo humano. Não apresenta tendência à degradação microbiológica e pode ser considerada ecologicamente correta. O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar o potencial dos antioxidantes Ácido Ferúlico (**AF**) 1,0 p/p ou Resveratrol (**RES**) 3,0 p/p como substâncias fotoestabilizadoras dos filtros solares químicos **BMBM** 5,0% p/p e **EHMC** 10,0% p/p em emulsão fotoprotetora (**BF**). As interações moleculares dos filtros com os antioxidantes foram avaliadas por Ressonância Magnética de Hidrogênio (¹H RMN) quantitativo, Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria TG, Análise qualitativa da supressão do estado energético singlete por meio da fluorescência, Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) e por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Foi avaliada a estabilidade preliminar, acelerada e normal, observando-se: características organolépticas e na Estabilidade Normal, adicionalmente, pH, fotoproteção, fotoestabilidade, atividade antioxidante *in vitro* e quantificação dos filtros solares por RMN. A segurança dos filtros **BMBM** e **EHMC** foi avaliada pelo ensaio de permeação cutânea em orelha de porco em célula de difusão de Franz. No ensaio de ¹H RMN quantitativo a adição de **RES** na solução com **EHMC+BMBM** conservou mais a razão *trans/cis* do **EHMC** (30,65) em relação a mesma solução sem Resveratrol (3,96), significando que a forma *trans* do **EHMC** possuiu a capacidade de absorver a radiação UVB, mantendo-se mais preservada com a adição de **RES** após irradiação de 13211J cm⁻². A adição de **AF** na solução com **EHMC+BMBM** conservou de forma menos expressiva a razão *trans/cis* do **EHMC** (7,71) em relação a solução **EHMC+BMBM** sem **RES** (3,96), sendo a forma *trans* do **EHMC** pouco preservada em relação a adição do **RES**. No ensaio de análise térmica pela avaliação TG foi possível observar que os filtros solares **BMBM** e **EHMC** indicaram elevada estabilidade térmica. A associação das técnicas (TG e DSC) permitiu obter evidências de interação química na mistura **EHMC + AF** e **BMBM + RES**. Nas demais misturas **EHMC + RES** e **BMBM + AF**, houve interação física. Na mistura **EHMC + RES** houve solubilização do **RES**. A degradação do **AF** foi retardada em mistura com **BMBM**. No ensaio de supressão do estado de energia singlete, a adição de **RES** auxiliou o retorno do filtro **BMBM** para o estado fundamental, devido a inibição da fluorescência. A inibição do estado de energia singlete favoreceu a fotoestabilidade do filtro solar. A adição de **AF** não suprimiu de forma tão evidente quanto a adição de **RES** na solução. No ensaio de FRET, as curvas dos antioxidantes **AF** e **RES** interceptaram a curva do **EHMC** e em relação ao **BMBM** não houve intercepção. No ensaio de EPR a amostra **EC+BF+AF** foi a que apresentou menor número de radicais livres após irradiação, o que corroborou com o alto percentual de inibição do radical DPPH[•]. Após exposição à radiação

UV, a ecdise de pele de cobra permaneceu com a presença de radicais livres, a radiação UVB modificou toda a cascata inflamatória e produziu espécies reativas de oxigênio (ROS). Com o tempo, estes radicais se reequilibraram. Na Avaliação da Estabilidade Preliminar e Acelerada, as formulações não apresentaram alteração de aspecto, cor e odor. Na Avaliação da Estabilidade Normal (AEN), a adição dos antioxidantes em **BF** reduziu o valor de pH. Na avaliação do FPS *in vitro* das formulações não submetidas à radiação, em todas as condições do estudo, a adição de **RES** praticamente manteve o valor de FPS quando comparado às formulações **BF+RES** ao longo dos 90 dias. Além disso, a adição dos antioxidantes não elevou o valor de FPS de forma expressiva e também não manteve o valor de FPS pós irradiação. O comprimento de onda crítico (λ_c) permaneceu acima de 370 nm, para todas as formulações, antes e após a irradiação no decorrer da AEN. Em relação ao parâmetro razão UVA/UVB a adição de **AF** não favoreceu a proteção UVA nessas condições. O percentual de conservação dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** por ^1H RMN foi maior com a adição de **RES** na base fotoprotetora no decorrer da AEN em todas as condições testadas. A atividade antioxidante da base fotoprotetora com **RES** obteve 97,0% de inibição de DPPH', sendo maior que a **BF** adicionada de **AF** (91.0%), contudo a concentração de **RES** foi maior que do **AF**. Após a irradiação, os sinais dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica de todas as amostras aumentaram em amplitude e o menor sinal em relação à amostra de ecdise de pele de cobra (**EC**) foi da amostra **EC+BF+AF**. Destaca-se que os espectros com os antioxidantes **AF** e **RES** tiveram seus sinais atenuados. Aproximadamente 72 h após a irradiação, a amostra com ecdise de pele de cobra aumentou levemente sua amplitude em relação às demais. A concentração dos filtros solares presentes no estrato córneo e na epiderme+derme foi inferior ou nulo nas formulações fotoprotetoras testadas. Com resultados mais satisfatórios para **BF+AF**. A adição de **RES** conservou a forma *trans* do **EHMC** de forma superior em relação à solução dos filtros sem antioxidante, após irradiação de 6h com dose elevada. A adição de **RES** inibiu o estado de energia singleto permitindo que o filtro solar **BMBM** permanecesse mais tempo no estado fundamental, significando menor degradação e maior capacidade de absorver a radiação UVA. Na Avaliação da estabilidade Acelerada ou Normal, as formulações se mantiveram estáveis nas condições de geladeira, estufa e ambiente em relação as características organolépticas. O fato de que os ingredientes nas formulações hidratam e nutrem, provavelmente conferiram proteção para o estrato córneo. O **AF** e **RES** por FRET demonstraram conseguir absorver a energia emitida pelo **EHMC** evitando a passagem pelo estado tripleto, favorecendo então a fotoestabilidade deste filtro solar, o mesmo não aconteceu em relação ao **BMBM**. No ensaio de atividade antioxidante, a adição de **RES** e **AF** elevaram a atividade antioxidante de forma significativamente diferente em relação a base fotoprotetora sem antioxidantes. Pelos espectros de EPR foi possível observar menor sinal em relação a EC para a amostra com **EC+BF+AF**, o que corrobora com o alto percentual de inibição do radical DPPH• por **AF**. A validação bioanalítica foi considerada adequada de acordo com a legislação brasileira e internacional. As formulações testadas podem ser consideradas seguras em relação a baixa permeação cutânea dos filtros solares **EHMC** e **BMBM** e segura quanto a eficácia fotoprotetora. Destacando melhor segurança para **BF+AF**. Como conclusão, a adição dos antioxidantes **AF** e **RES** protegeram a formulação fotoprotetora por mecanismos diferentes, sendo seu uso multifuncional para formulações fotoprotetoras.

Palavras chaves: Ferulic acid, Resveratrol, avobenzona, methoxycinnamato de octila, permeação

ABSTRACT

FREIRE, T. B. Influence of antioxidants on the photostabilization of avobenzone (UVA filter) and octyl p-methoxycinnamate (UVB filter) in sunscreens. 2022. (Doctoral Thesis). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

In order to promote broad-spectrum protection, most sunscreens are combined with two or more organic filters, aiming at protect against UVA and UVB radiation. The combination of avobenzone (**BMBM**), UVA filter, and octyl ρ -methoxycinnamate (**EHMC**), UVB filter, is widely used in manipulated and industrialized formulations, but there may be changes in spectral absorption after exposure to UV radiation, compromising the efficacy photoprotective. In order to reduce the instability of the combination of filters, photostabilizer agents are added. Antioxidants of natural origin are used in medicines and cosmetics with several benefits, such as: photoprotective, anti-aging, moisturizing and anti-polluting action. The human epidermis has an important barrier effect and limited antioxidant capacity, therefore studies with the epidermis are essential. Snakeskin ecdysis (SE) is composed of stratum corneum and provides a similar barrier to the human stratum corneum. It has no tendency to microbiological degradation and can be considered ecologically correct. The main objective of this research was to evaluate the potential of two antioxidants Ferulic Acid (**FA**) 1.0 p/p or Resveratrol (**RES**) 3.0 p/p as photostabilizing substances in chemical sunscreens **BMBM** 5.0% p/p **EHMC** 10.0% w/w Photoprotective emulsion (PB). The molecular interactions of filters with the antioxidants were evaluated by quantitative Hydrogen Magnetic Resonance (^1H NMR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TG), Qualitative analysis of singlet energy state suppression by means of fluorescence, Spectroscopy Förster Resonance Energy Resonance (FRET) and by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). Preliminary, accelerated and normal stability, additionally, pH, photoprotection, photostability, *in vitro* antioxidant activity and quantification of sunscreens by NMR. The safety of **BMBM** and **EHMC** filters was evaluated by the skin permeation assay in pig ear in Franz diffusion cell. In the quantitative ^1H NMR assay, the addition of **RES** in the solution with **EHMC+BMBM** preserved more the *trans/cis* ratio of **EHMC** (30.65) compared to the same solution without Resveratrol (3.96), meaning that the *trans* form of **EHMC** had the ability to absorb UVB radiation, remaining more preserved with the addition of **RES** after irradiation of 13211J cm^{-2} . The addition of **FA** in the solution with **EHMC+BMBM** preserved the *trans/cis* ratio of **EHMC** (7.71) less significantly than in the **EHMC+BMBM** solution without **RES** (3.96), with the *trans* form of **EHMC** being poorly preserved regarding the addition of the **RES**. In the thermal analysis using the TG technique, it was possible to observe that the **BMBM** an **EHMC** sunscreens indicated high thermal stability. The association of techniques TG and DSC allowed to obtain evidence of chemical interaction in the **EHMC+FA** and **BMBM+RES** mixture. In the other mixtures **EHMC+RES** and **BMBM+FA**, there was physical interaction. In the **EHMC+RES** mixture there was solubilization of the **RES**. The degradation of **FA** was retarded in mixture with **BMBM**. In the singlet energy state suppression assay, the addition of **RES** helped the **BMBM** filter return to ground state due to fluorescence inhibition. The inhibition of the singlet energy state favored the photostability of the sunscreen. The addition of **FA** did not suppress as evidently as the addition of **RES** to the solution. In the FRET assay, the curves of antioxidants **FA** an **RES** intersected the curve of **EHMC** in the relation to the **BMBM** there was no intercepted. In the EPR test, the sample **EC+BF+FA** showed the lowest number of free radicals after irradiation, which corroborated the high percentage of inhibition of the $\text{DPPH}\cdot$ radical. After exposure to UV radiation, snake skin ecdysis remained with the presence of free

radicals, UVB radiation modified the entire inflammatory cascade and produced Reactive Oxygen Species (ROS). Over time, these radicals rebalanced. In the assessment of Preliminary and Accelerated Stability, the formulations showed no change in appearance, color and odor. In the assessment of Normal Stability (AEN), the addition of antioxidants in **BF** reduced the pH value. In evaluating the in vitro SPF of formulations not subjected to radiation, under all study conditions, the addition of **RES** practically maintained the SPF value compared to **BF+RES** formulations throughout the 90 days. Furthermore, the addition of antioxidants did not significantly increase the SPF value and also did not maintain the SPF value after irradiation. The critical wavelength (λ_c) remained above 370nm, for all formulations, before and after irradiation during the AEN. Regarding the UVA/UVB ratio parameter, the addition of **FA** did not favor UVA protection under these conditions. The percentage of conservation of **BMBM** and **EHMC** sunscreens by ^1H NMR was higher with the addition of **RES** in the photoprotective base during the AEN in all conditions tested. The antioxidant activity of the photoprotective base with **RES** obtained 97.0% inhibition of $\text{DPPH}\cdot$, being higher than the **BF** added with **FA** (91.0%), however the concentration of **RES** was higher than that of **FA**. After irradiation, the signals from the electronic paramagnetic resonance spectra of all samples increased in amplitude and the smallest signal in relation to the snake skin ecdysis (**EC**) sample was from the **EC+BF+FA** sample. It is noteworthy that the spectra with the **FA** and **RES** antioxidants had their signals attenuated. Approximately 72h after irradiation, the sample with snake skin ecdysis slightly increased its amplitude in relation to the others. The concentration of sunscreens present in the stratum corneum and epidermis+dermis was lower or null in the tested photoprotective formulations. With more satisfactory results for **BF+FA**. The addition of **RES** preserved the *trans* form of **EHMC** in a superior way in relation to the solution of the filters without antioxidant, after 6h irradiation with high dose. The addition of **RES** inhibited the singlet energy state allowing the **BMBM** sunscreen to remain in the ground state longer, meaning less degradation and greater capacity to absorb UVA radiation. In the assessment of Accelerated or Normal stability, the formulations remained stable under the conditions of refrigerator, oven and environment in relation to organoleptic characteristics. The fact that the ingredients in the formulations moisturize and nourish probably conferred protection to the stratum corneum. The **FA** and **RES** by FRET demonstrated to be able to absorb the energy emitted by the **EHMC**, avoiding the passage through the triplet state, thus favoring the photostability of this sunscreen, the same not happening in relation to the **BMBM**. In the antioxidant activity assay, the addition of **RES** and **FA**, improved the antioxidant active in relation to **BF** without antioxidants. From the EPR spectra, it was possible to observe a lower signal in relation to **EC** in the sample with **EC+BF+FA**, which corroborates the high percentage of inhibition of the $\text{DPPH}\cdot$ radical by **AF**. Bionalytical was considered adequate in accordance with Brazilian and International legislation. The tested formulations can be considered safe in relation to low skin permeation of **EHMC** and **BMBM** sunscreens and safe in terms of photoprotective efficacy. Highlighting better security for **BF+FA**. In conclusion, the addition of **FA** and **RES** antioxidants protected the photoprotective formulation by different mechanisms, and its use is multifunctional of photoprotective formulations.

Palavras chaves: Ferulic acid, Resveratrol, avobenzone, octyl methoxycinnamate, permeation

1. INTRODUÇÃO

A exposição excessiva a radiação solar é um problema de saúde pública. Estima-se que haverá em 2021 8.450 novos casos de câncer de pele no Brasil. Número de mortes no Brasil segundo o Atlas de Mortalidade por Câncer (2019), 1.978, sendo que 1.159 de homens e 819 de mulheres (INCA, 2020). A incidência global anual de câncer de pele do tipo melanoma é de 132.000 casos, e cerca de 2 a 3 milhões de cânceres de pele do tipo não melanoma (WHO, 2021). Na década passada (2011-2021), o número de novos casos de melanoma invasivo diagnosticados anualmente aumentaram 44%. A população mais vulnerável aos efeitos da exposição solar excessiva são as crianças e os jovens que vivem em países localizados próximos à linha do Equador (SKIN CANCER FOUNDATION, 2021).

A radiação ultravioleta (UV) faz parte da radiação solar e penetra na pele e interage com as diferentes células localizadas nas diferentes camadas, de acordo com o comprimento de onda. Segundo Montagner & Costa (2009) a radiação de ondas curtas (UVB/290-320nm) é mais absorvida na epiderme e afeta os corneócitos que são células queratinizadas localizadas no estrato córneo e queratinócitos que são as demais células da epiderme em processo de queratinização (BAUMANN, 2002). As ondas mais longas (UVA/320-400nm) penetram de modo mais profundo e atingem queratinócitos na epiderme e fibroblastos da derme, causando degradação das fibras de colágeno e elastina que são responsáveis pela sustentação da pele, gerando flacidez e rugas (MONTAGNER & COSTA, 2009).

Os efeitos deletérios dos radicais livres no envelhecimento precoce e na predisposição ao aparecimento do câncer estão intensamente associados à radiação solar. Dentre as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), podemos destacar o peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas ou superperóxidos, radicais peroxila e alcoxila, oxigênio singleto, orgânicos (ROOH) e outras espécies reativas de nitrogênio, como por exemplo o óxido nítrico (NO) (KANSKI *et al.*, 2001; POPOV *et al.*, 2009). Os antioxidantes sequestram os radicais livres e, por esse motivo, podem proteger as células diante do estresse oxidativo (LOHAN *et al.*, 2015).

A radiação UVB é a principal causa direta de danos fotoquímicos ao DNA contribuindo para mutações genéticas. No entanto, a UVA causa danos indiretos ao DNA, por via da geração de EROs (MOYAL, 2012).

O uso de protetor solar é a forma preventiva que protege a pele da ação negativa da radiação UV, retardando os efeitos do envelhecimento extrínseco, melhorando sua aparência, minimizando as marcas de rugas, manchas e flacidez. Mais importante que o foco estético, é o

aspecto da saúde, pois o uso deste tipo de produto é uma das formas de proteger a pele e retardar a possibilidade de aparecimento do câncer de pele.

Com o intuito de promover a proteção de amplo espectro, a maioria dos protetores solares disponíveis no mercado possuem ao menos dois filtros orgânicos em associação, um com proteção ideal na região UVB e outro na UVA. Dois representantes de tais classes de filtros UV químicos são os cinamatos (filtro UVB), como o *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (EHMC) e os dibenzoilmetanos (filtro UVA), como a *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (BMBM). Eles estão associados em várias formulações disponíveis comercialmente, mas para promover a fotoestabilidade desta combinação é necessária a adição de um fotoestabilizador. Fotoestabilidade, significa manter a capacidade do filtro solar de absorver radiação UV, elevar o valor de FPS não garante que o filtro continue absorvendo radiação após excitação. Segundo Kawakami & Gaspar (2015) notaram que mangiferina aumentou a fotoestabilidade e reduziu o potencial fototóxico da combinação de naringenina e avobenzona.

No mercado são utilizados fotoestabilizadores como cinamatos, derivados de cânfora ou triazinas no desenvolvimento de protetores solares contendo o *Butyl Methoxydibenzoylmethane*. Porém, por informações da literatura científica muitas das substâncias empregadas, não foram capazes de diminuir a formação das EROs, colocando em risco o usuário. Acredita-se que a fotoinstabilidade do *Butyl Methoxydibenzoylmethane* é biologicamente relevante e tem sido evidenciada por danos no DNA, citotoxicidade de queratinócitos humanos e peroxidação lipídica (PARIS *et al.*, 2009; CHAUDHURI *et al.*, 2006).

A instabilidade fotoquímica dos produtos fotoprotetores contendo vários ingredientes que são filtros solares representam um desafio a ser vencido em função da relevância do problema que ocasionam. Investigações sistemáticas de alterações fotoinduzidas na absorção de protetores comerciais revelaram que nem a combinação complexa de filtros orgânicos ou a adição de filtros inorgânicos podem evitar sua fotoativação. Os autores BREZOVA *et al.* (2005) obtiveram resultados que confirmaram a fotoestabilidade elevada dos protetores solares na região do UVB, mas houve considerável redução da fotoestabilidade no UVA. A ativação fotoquímica dos filtros UVA podem resultar na formação de EROs e intermediários tóxicos, os quais podem provocar dano na pele. A investigação da fotoestabilidade de formulações fotoprotetoras deveria ser exigida antes da comercialização.

Segundo Pinto *et al.* (2002), produtos naturais de origem vegetal são importantes e promissoras fontes de substâncias bioativas, muitos constituem modelos para a síntese de um elevado número de fármacos e substâncias cosméticas funcionais.

Devido à semelhança estrutural dos flavonoides com os filtros solares químicos, adicionalmente às propriedades antioxidantes, esta classe apresenta potencial na fotoestabilização de filtros solares químicos (SCALIA & MEZZENA, 2010; VELASCO *et al.*, 2008). Trabalho mencionado na literatura científica verificou que o flavonoide rutina apresentou resultados positivos na fotoestabilização de formulações fotoprotetoras com os filtros químicos BMBM e EHMC (PINTO, 2014).

O composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico) é um antioxidante encontrado nas mais diversas fontes naturais (milho, café, beterraba e outros). Na literatura há relatos de sua eficácia fotoprotetora frente à radiação UVB. A absorção dos raios UV pelo ácido ferúlico isolado catalisa a formação estável do radical fenoxi, potencializando sua capacidade de interromper as reações em cadeia dos radicais livres. Ele possui capacidade de neutralizar as EROS como peróxidos e hidroxilas (PERES, 2015). Devido suas propriedades antioxidantes, diversos estudos envolvem este ingrediente ativo na prevenção de estresse oxidativo envolvendo células da pele expostas à radiação UV.

O Resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) é um composto fenólico da classe dos estilbenos e possui potente atividade antioxidante (LANGE, HERBELÉ, MILÃO, 2009). Reis *et al.* (2014) avaliaram o sinergismo e a fotoproteção de moléculas sintetizadas por hibridização molecular de *trans*-resveratrol com os filtros BMBM e EHMC.

Ácido ferúlico e Resveratrol são relatados como antioxidantes, porém também são absorvedores de raios ultravioleta, o que justifica a elaboração de fotoprotetor de caráter multifuncional (ROJAS, LONDOÑO, CIRO, 2016; PERES *et al.*, 2018). Em adição da possibilidade de sinergismo com os filtros solares, favorecendo a diminuição de suas concentrações. Este estudo objetivou avaliar o potencial de fotoestabilização dos antioxidantes ácido ferúlico e Resveratrol em associação com filtros químicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Exposição solar e câncer de pele

A exposição prolongada da pele pela radiação UV provoca efeitos deléteiros a saúde e a estética como envelhecimento precoce, alteração na pigmentação, inflamação e carcinoma. Além disso, o dano a barreira epidérmica provocado pela exposição UV altera a expressão de proteínas, diminui as ligações covalentes entre as ceramidas, aumenta a espessura do estrato córneo e a perda de água transepidérmica (TEWL). Fotoprotetor de amplo espectro com ceramidas 1, 3 e 6 em adição de lipídeos essenciais para a pele conseguiu proteger pele humana doada após abdominoplastia (*ex vivo*), destas alterações (BARRESI *et al.*; 2021).

A exposição elevada e intermitente a radiação solar é um fator de risco significativo para o desenvolvimento do melanoma maligno. As pessoas de pele branca e com cabelos e olhos claros possuem maior risco, principalmente nas áreas de menor latitude do globo, ou seja, próximo a linha do Equador, como por exemplo Brasil e Austrália. Outros fatores estão relacionados, como a exposição intensa na infância e adolescência, exposição a câmeras de bronzeamento artificial, predisposição ao câncer de pele, ceratoses e cânceres de pele não melanomas (WHO, 2021; INCA, 2020). Estima-se que uma redução de 10% nos níveis da camada de ozônio resultará em 300.000 casos adicionais de câncer de pele não melanoma e 4.500 casos de melanoma (WHO, 2021).

A incidência de câncer de pele não melanoma e melanoma tem aumentado nas últimas décadas. Ocorrem globalmente a cada ano entre 2 e 3 milhões de cânceres de pele não melanoma e 132.000 cânceres de pele melanoma (WHO, 2021). Há uma menor incidência do melanoma (3%) no Brasil em relação ao tipo não melanoma (30%), porém é mais agressivo, com maior chance de metástase (INCA, 2020). O câncer de pele melanoma tem origem nos melanócitos, células produtoras de melanina que confere cor para a pele. Nos indivíduos de pele negra, ele é mais comum nas áreas claras, como palmas das mãos e plantas dos pés. A doença surge na pele normal ou em manchas e pintas existentes, estas podem ser escuras e com bordas irregulares, podendo estar presente também coceira e descamação (INCA, 2020).

Como medidas de prevenção é necessário evitar tomar banho de sol no período de 10h às 16h, quando os raios são mais intensos. Recomenda-se usar roupas, bonés ou chapéus de abas largas, óculos escuros com proteção UV, sombrinhas e barracas. Não esquecer de aplicar na pele 15min antes de se expor ao sol, protetor solar com fator de proteção solar (FPS) de no mínimo 15 e usar filtro solar específico para os lábios (INCA, 2020).

2.2. Fotoestabilidade

O filtro solar necessita ser fotoestável para oferecer proteção efetiva frente aos raios UV. Sem esta capacidade, podem se degradar e surgir reações fotoalérgicas na pele humana (SOUSA, 2015). Os filtros solares orgânicos são excitados por fótons UV, íons rápidos e energéticos. Estes saem do estado fundamental e seus elétrons migram para um orbital de maior energia. Quando o spin do elétron mantém sua orientação original após excitado, o denominamos de estado excitado singlete (presença de um campo magnético) e este retorna rapidamente ao estado fundamental liberando um fóton, mas se retornar para um nível menos energético com inversão da orientação do spin do elétron (estado tripleto), há um atraso no retorno do estado fundamental.

Uma associação à baixa fotoestabilidade dos filtros solares orgânicos com o retorno para o estado tripleto de energia (três estados quantizados) é mencionada na literatura (PINTO, 2014).

É necessário o retorno ao estado fundamental para que o filtro solar continue absorvendo energia (HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010; PINTO, 2014).

2.3. *Butyl Methoxydibenzoylmethane*

O *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (avobenzona/ BMBM), fórmula molecular $C_{20}H_{22}O_3$, conhecido como avobenzona foi introduzido no mercado no final da década de 80 e início da 90, sendo o primeiro a ofertar proteção frente aos raios UVA (320-400nm). Com máxima absorção na faixa de 350 a 365nm dependendo do solvente utilizado (TREBSE *et al.*, 2016). Filtro solar orgânico, insolúvel em água, que está em equilíbrio tautométrico na forma enol-ceto por ser uma β -dicetona (KOCKLER *et al.*, 2012).

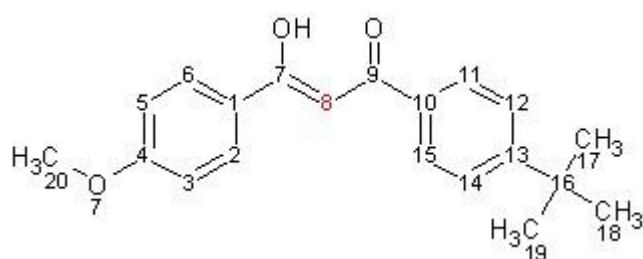
A forma enólica absorve a radiação no comprimento de onda de 340-365nm (**Figura 1**). Quando exposto a radiação UV, ocorre significativa degradação com fototautomerização para a forma cetônica, forma que perde parte da capacidade de absorver os raios UVA, ou seja, quando há conservação da forma enol do *Butyl Methoxydibenzoylmethane*, sua capacidade de absorver os raios UVA é mantida (**Figura 1**) (PINTO, 2014, BALOGH *et al.*, 2011). Trebse *et al.* (2016), concluíram que a radiação UVC como etapa adicional do tratamento de água com hipoclorito de sódio gerou cerca de 25 produtos de degradação da avobenzona, com efeitos deletérios como reações alérgicas e irritações cutâneas. Na literatura, há poucos estudos sobre a toxicidade destes produtos de degradação. Embora o **BMBM** seja estável em solventes orgânicos sob irradiação UV, a presença de água leva a degradação fotoquímica da molécula, com formação de dois pares de aldeídos e ácidos benzóicos substituídos. Quanto mais prolongada a irradiação, maiores são os níveis destes produtos (TREBSE *et al.*, 2016).

A fotodegradação acarreta a decomposição irreversível da molécula, ocorrendo a α -clivagem da dicetona no estado excitado tripleto, formando espécies radicais carbono centradas que sofrem abstração de prótons, oxidação ou recombinação radical, os quais podem ser prejudiciais para a saúde humana (MURPHY *et al.*, 2020).

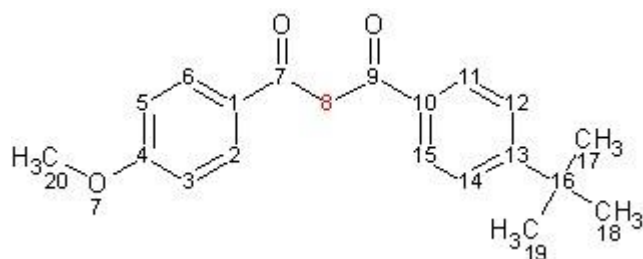
Na literatura, estudos mencionaram melhor fotoestabilidade do *Butyl Methoxydibenzoylmethane* em solventes polares em relação aos apolares (MURPHY *et al.*, 2020). MURPHY *et al.* (2020), sendo que a adição de antioxidantes melhorou sua fotoestabilidade. Chatelain & Gabard (2001) avaliaram se o *Bis-ethylhexyloxyphenol*

Methoxyphenyl triazine poderia minimizar a desestabilização do *p*-metoxicinamato de octila em adição da avobenzona e concluíram que a adição de filtros solares de amplo espectro com alta fotoestabilidade, como é o caso do *Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine*, que minimizou as alterações fotoquímicas na combinação de filtros UVB com os filtros UVA.

Figura 1. Fórmulas estruturais (enólica e cetônica) do *Butyl methoxydiben-zoylmethane* (BMBM) (MITURI & MARTINCIGH, 2008; PINTO 2014).



Forma enol

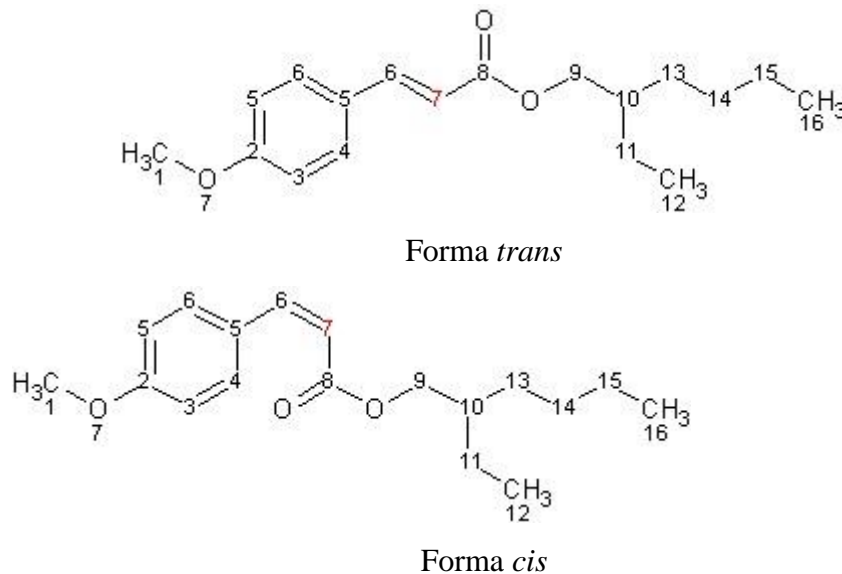


Forma ceto

2.4. Ethylhexyl Methoxycinnamate

Desenvolvido na década de 1950 pertence ao grupo dos cinamatos, filtros UVB mais populares nos Estados Unidos e na Europa. Filtro solar orgânico, fórmula molecular $C_{18}H_{26}O_3$, é insolúvel em água, de amplo uso em formulações fotoprotetoras com absorção na região do UV 270-328nm. Com exposição a radiação UV pode ocorrer isomerização da estrutura (**Figura 2**) (PINTO, 2014; MOTA *et al.*, 2013; BALOGH *et al.*, 2011). Pattanaargson & Limphong (2001) avaliaram a fotoestabilidade do EHMC e os seus produtos de fotodegradação e notaram a mudança da forma *trans* para a forma *cis*. Possui baixa emissão de fluorescência (KRISHNAN & NORDLUND, 2008).

Figura 2. Fórmulas estruturais do *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (EHMC), *trans* e *cis* (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001; PINTO, 2014).



2.5. Pele e sua atividade antioxidante

A radiação ultravioleta (UV) favorece a geração de radicais livres na epiderme, enquanto a UVA diminui os níveis de antioxidantes, inativa enzimas antioxidantes e aumenta os marcadores detectáveis de peroxidação lipídica na pele (HERRLING *et al.*, 2003; POPOV *et al.*, 2009).

As Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) propiciam o estresse oxidativo, peroxidação lipídica, a liberação de fosfolípidos de membrana, danos diretos e indiretos ao DNA associados a carcinogênese e formação de prostaglandinas, relacionadas aos processos inflamatórios.

Além da formação de radicais induzidos por fatores externos como a radiação UV, luz visível, infravermelho e xenobióticos, ocorre a formação de radicais endógenos, presentes naturalmente em reações bioquímicas e fisiológicas, como: espécies radicais de oxigênio, superóxido (O_2^-), radical oxigênio singlete (1O_2), hidroxila (OH) e óxido nítrico (NO), por exemplo. Em condições normais, o número de radicais é balanceado por enzimas e antioxidantes endógenos (DARIO *et al.*, 2013; DARVIN *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2020; POPOV *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2010).

De acordo com Silva, Michniak-Kohn, Leonardi (2017a), antioxidantes são compostos que inibem ou bloqueiam o processo de formação dos radicais livres. Devem ser oxidados primeiramente em relação ao agente protegido. Antioxidantes de origem natural são usados em medicamentos e cosméticos com benefícios diversos, como ação fotoprotetora tópica,

antienvhecimento, hidratação e antipoluição (DARIO, BABY, VELASCO, 2015; MARTINS *et al.*, 2020; SILVA, MICHNIAK-KOHN, LEONARDI, 2017a; PERES, 2018). Estudos recentes avaliaram sua ação na fotoestabilidade de filtros solares com os compostos fenólicos que são conhecidos por sua ação antioxidante (PERES, 2015).

Os compostos fenólicos demonstraram capacidade de promover a inibição enzimática de proteinases específicas como collagenase e elastase. Estas enzimas promovem a degradação de fibras estruturais importantes, como o colágeno e a elastina, favorecendo o envelhecimento da pele. Os estudos com antioxidantes de origem natural são tendência na cosmética (DARIO, BABY, VELASCO, 2015).

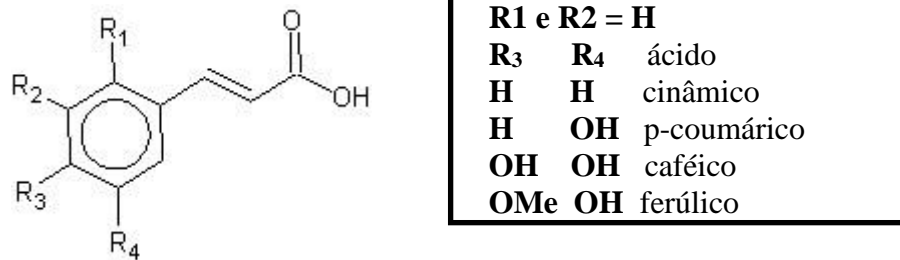
De acordo com Martins *et al.* (2020) os mecanismos antioxidantes na epiderme são mais perceptíveis em relação à derme, devido as proteínas do “envelope” cornificado e à alta concentração de antioxidantes de baixo peso molecular que atuam em conjunto. Esses antioxidantes atuam de várias maneiras como quelação de íons metálicos ou neutralizando os radicais livres diretamente.

De acordo com Rinnerthaler *et al.* (2015), a epiderme humana tem um importante efeito barreira e capacidade antioxidante quando jovem, sendo que o próprio “envelope cornificado” possui capacidade antioxidante, logo estudos com a epiderme é essencial.

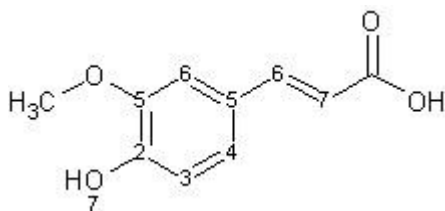
2.6. Ácido Ferúlico

Rojas, Londoño e Ciro (2016) relataram que polifenóis solúveis e insolúveis absorvem eficientemente a radiação no intervalo 304-350nm e 352-385nm, respectivamente. Como os derivados do ácido cinâmico, temos: ácido ferúlico, caféico e *p*-coumarico (**Figura 3**), que absorvem de 280 a 320 nm (UVB) (ROJAS, LONDOÑO, CIRO, 2016; PERES *et al.*, 2018).

O ácido ferúlico (*4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid*) (**Figura 4**), possui fórmula molecular C₁₀H₁₀O₄, sendo solúvel nos solventes PEG-400, DMSO e *Ethoxydiglycol* (Transcutol® CG) e com valor de pKa 4,42. Valores de pKa > 4,0 para ácidos e <10,0 para bases são determinantes para a permeação de membrana (interface hidrófila/hidrofóbica), acentuado com aumento da concentração do ativo (FISCHER, GOTTSCHLICH, SEELIG, 1998). É um composto químico extraído de plantas e surge, principalmente, do metabolismo de sementes e folhas, na produção de fenilalanina e tirosina. Uma das mais importantes características biológicas comprovadas é seu potencial antioxidante devido seu núcleo fenólico, com capacidade de eliminar formas reativas derivadas de oxigênio (SHAKEEL *et al.*, 2017; MACHADO & FREITAS, 2013).

FIGURA 3. Esquema dos derivados do ácido cinâmico

Fonte: adaptado de MIRANDA *et al.*, 2000.

FIGURA 4. Fórmula estrutural do ácido ferúlico

Fonte: SHAKEEL *et al.*, 2017.

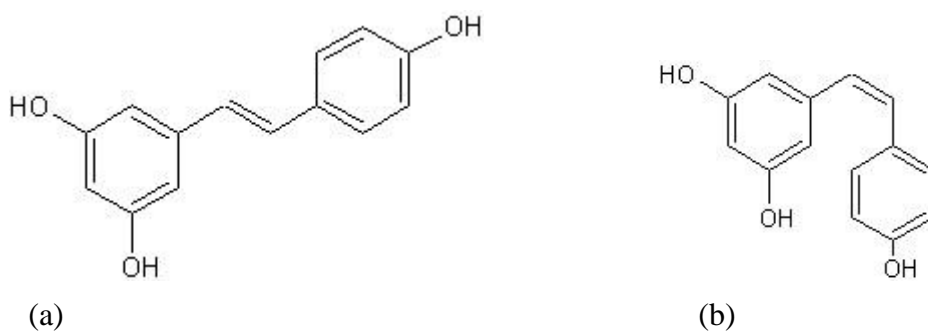
2.7. Resveratrol

Na literatura existem conflitos de informações sobre a classificação de compostos fenólicos com atividade fotoprotetora. Alguns autores denominam o ingrediente Resveratrol de flavonóide. Porém, ele é um estilbeno. O Resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno), fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, é um composto químico de baixo peso molecular ($228.25 \text{ g.mol}^{-1}$) possui alta atividade antimicrobiana, é extraído de espermatófitas das cascas de uvas e possui absorção principal na faixa do UVA (POLONINI *et al.*, 2013). Sua molécula pode conter as formas isoméricas *trans* e *cis* (**Figura 5**), porém a *cis* não pode ser encontrada na extração da uva, mas a forma *trans* é facilmente encontrada na natureza e é mais estável. É solúvel em óleo e nos solventes orgânicos: etanol 16 mg.mL^{-1} e Dimetilsulfóxido (DMSO) a aproximadamente 50 mg.mL^{-1} . É praticamente insolúvel em água, cerca de 3 mg.100mL^{-1} (RODRIGUÉZ *et al.*, 2012; PUBCHEM, 2019b; AMRI *et al.*, 2012).

Por ser um composto fenólico, o Resveratrol contribui para o potencial antioxidante do vinho e das cascas das uvas. Sua capacidade de doar hidrogênios e elétrons para neutralizar os radicais livres e os radicais peroxil justifica a sua ação antioxidante e de interrupção da peroxidação lipídica (ALONSO *et al.*, 2017; RODRIGUÉZ *et al.*, 2012). Possui atividade microbiana frente a dermatófitos e ao vírus herpes simplex, também possui potencial como agente quimiopreventivo de câncer de pele e ativador das proteínas sirtuins. Na área dermatológica pode ser utilizado como fitoestrogênio.

Estudos demonstraram que o *trans*-resveratrol é capaz de prevenir dano cutâneo oriundo dos raios UV *in vivo* e câncer de pele induzido por produtos químicos (DETONI *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2008). O antioxidante Resveratrol é estável no mínimo 28 dias quando completamente protegido da luz e em tampões com valores de pH 1,0-7,0. A estrutura molecular do Resveratrol possui vários locais de protonação, suas constantes de dissociação ácida (pKa) são de 8,01; 9,86 e 10,50 (FIGUEIRAS, NEVES-PETERSON, PETERSEN, 2011; HUNG *et al.*, 2008). Possui forte tendência a isomerização quando exposto à radiação UV (RODRIGUÉZ *et al.*, 2012). Amri e colaboradores (2012) mencionaram que houve a formação de 90,6% da forma *trans* para *cis* quando irradiado por 120min.

FIGURA 5: Fórmula estrutural do *trans*-resveratrol (a) e *cis*-resveratrol (b)



Fonte: DEKIĆ *et al.*, 2008.

2.8. Técnicas de Avaliação

2.8.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica espectroscópica fornece informações relevantes sobre interações entre moléculas e substâncias presentes, além disso, utiliza o mesmo padrão para diversos analitos. Para análise de ^1H RMN é desejável evitar contaminações com a água e maior cuidado com solventes higroscópicos, como é o caso do dimetilsulfóxido deuterado $\text{DMSO-}d_6$. Para a quantificação por esta técnica, se analisa a área do sinal da ressonância que é proporcional ao número de núcleos ressonantes. Este fato permite a determinação precisa do número de estruturas moleculares, e conseqüentemente, de substâncias presentes em meio sólido ou líquido (PINTO, 2014; GADAPE & PARIKH, 2011; MALZ, 2008; MALZ & JANCKE, 2005).

Para uma resolução adequada, campos magnéticos elevados são necessários, principalmente nos espectros de ^1H RMN (ZANGGER, 2015). A técnica de quantificação por RMN permite a validação de metodologia analítica com precisão e exatidão adequadas,

mesmo para amostras complexas, como formulações cosméticas (BATISTA *et al.*, 2008; DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006). Esta técnica possui vantagem em relação a técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) devido a redução de solventes (PINTO, 2014; SIMPSON, MCNALLY, SIMPSON, 2011). A técnica de RMN quantitativa possui, também, outras vantagens como: na determinação de razões não existe a necessidade de calibrações de intensidade; o tempo de análise é reduzido; o caráter não destrutivo da amostra; não necessita de separação prévia do analito em uma mistura; há a possibilidade de determinação de mais de uma substância simultaneamente; a utilização de somente um padrão de calibração para múltiplos analitos (MALZ & JANCKE, 2005, WELLS *et al.*, 2002).

Na literatura, há poucos trabalhos utilizando a técnica de RMN para quantificar e estudar alterações nas moléculas dos filtros solares. A quantificação de ativos farmacêuticos é mais comum, como por exemplo fenacetina e ácido acetilsalicílico (PINTO, 2014; MALZ, 2008; JUNGnickel & FORBES, 1963; HOLLIS, 1963).

MURPHY *et al.* (2020) caracterizou o isótopo análogo da avobenzona por ^1H RMN. Os autores observaram um equilíbrio tempo dependente entre os isômeros *enol* e *dicetona* em solução de Clorofórmio (CDCl_3), observaram, também, a geração de fotoprodutos pós radiação UV. Dondi, Albini & Serpone (2006), utilizaram a técnica de RMN para avaliar as interações de BMBM com EHMC, quando expostos à irradiação artificial. Os fotoprodutos gerados foram identificados por espectroscopia UV/visível, CLAE e por RMN ^1H e ^{13}C . Porém, não foi avaliado simultaneamente com a adição de um fotoestabilizador.

2.8.2. Análise Térmica

A Termogravimetria (TG) e a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) estão compreendidas no conjunto de técnicas denominadas de “análise térmica”, sendo que uma propriedade física é mensurada a partir de uma variação controlada de temperatura e atmosfera.

A variação de massa (TG) e calorimetria (DSC) de uma determinada amostra é quantificada em função da variação da temperatura ou tempo. Ambas técnicas são aplicadas na avaliação de desidratação e investigação de polimorfismo, além disso, a TG e a DSC são capazes de avaliar a estabilidade e grau de pureza de uma determinada amostra, respectivamente. Assim, tais estudos contribuem para o processo de caracterização, determinação do prazo de validade e cálculo de parâmetros cinéticos, permitindo avaliar o comportamento do ingrediente ativo em formulações cosméticas (BROWN & GALLAGHER, 2011; PINTO, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2014).

Além de todas as aplicações citadas anteriormente, a DSC e a TG são poderosas aliadas na escolha dos componentes de uma formulação, uma vez que são capazes de avaliar a compatibilidade física e/ou química entre os ingredientes. A presença de interação pode influenciar na estabilidade da formulação que, conseqüentemente, irá interferir na eficácia dos ingredientes cosméticos. Estudos recentes comprovaram a eficácia da análise térmica em estudos de compatibilidade entre filtros solares orgânicos e flavonoides, além do fato de ser uma técnica de melhor custo-benefício quando comparada com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (PINTO, 2014).

2.8.3. Análise qualitativa da supressão do estado energético singleto

Nas formulações fotoprotetoras é comum o emprego de foto-estabilizadores sintéticos que auxiliam no recebimento de energia do estado singleto e/ou tripleto da molécula protegendo-a de alterações fotoquímicas. Suprimindo o estado singleto, permite-se que a molécula fique no estado fundamental e absorva energia, reduzindo, também, o estado excitado tripleto (PINTO, 2014; BONDA, 2008).

Por meio da fluorescência percebida visualmente, é possível verificar se há supressão do estado de energia singleto do cromóforo de molécula orgânica absorvedora de UV. É adicionada uma substância fotoestabilizadora e após, a mistura e o absorvedor UV são excitados para verificar se houve ou não a supressão do estado singleto que é observada pela diminuição da fluorescência. Caso a substância adicionada diminua a fluorescência, pode ser considerada um fotoestabilizador adequado (HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010).

O conhecimento das características físico-químicas dos ingredientes ativos somadas as técnicas mencionadas anteriormente, permite verificar por diferentes mecanismos, a ação dos antioxidantes na fotoestabilidade e proteção térmica dos filtros solares alvos neste estudo.

2.8.4. Triagem de antioxidantes como potencial fotoestabilizador (FRET)

Os filtros solares químicos isolados ou incorporados em formulações são excitados após absorção da radiação ultravioleta. Ao retornar ao estado fundamental parte desta energia da molécula é convertida em calor, luz visível e/ou fluorescente. Alguns filtros solares químicos possuem dificuldade em retornar rapidamente ao estado fundamental, desta forma diminuindo sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta. O processo que desativa uma molécula excitada ou altera a transferência de energia, como os mecanismos de extinção do estado singleto e tripleto, podem ser aplicados para auxiliar o rápido retorno ao estado fundamental da estrutura química (BONDA, 2008; KAWAKAMI *et al.*, 2017).

Uma molécula doadora em um estado excitado pode, sob certas condições, transferir energia de seu estado excitado para uma receptora próxima. A molécula doadora retorna ao estado fundamental e a receptora é levada ao estado excitado. Esta dissipa a energia do seu estado excitado e retorna ao estado fundamental. Dois mecanismos são responsáveis pela transferência de energia deste tipo: o primeiro é o dipolo induzido ou interação Coulombic, análogo a um mecanismo de “antena transmissora”. O elétron excitado oscilante de uma molécula doadora gera um campo eletromagnético que, por sua vez, excita um dos elétrons da estrutura receptora para um orbital de maior energia. Esta ação ocorre à distância, embora diminua em força com o inverso da sexta potência da distância entre a molécula doadora e a receptora (BONDA, 2008).

A energia do segundo tipo é transferida por um mecanismo colisional ou de troca. As moléculas doadoras e receptoras estão próximas o suficiente para que suas nuvens de elétrons se sobreponham, permitindo a troca de elétrons excitados da molécula doadora com o da molécula receptora no estado fundamental. Normalmente, esta troca ocorre quando a molécula doadora está no estado excitado tripleto. Após, esta retorna ao estado fundamental e a estrutura receptora é elevada ao estado tripleto de excitação, processo conhecido como transferência de energia tripleto-tripletto. Tanto o mecanismo Coulombic como o de troca de elétrons podem ocorrer quando a molécula doadora está no estado excitado singleto; o segundo mecanismo opera somente quando o doador está no estado excitado tripleto (BONDA, 2008).

A transferência de energia tripleto-tripletto pelo mecanismo de troca de elétrons é o mais comum de transferência de energia da fotoquímica orgânica e em sistemas de proteção solar. Todos os fotoestabilizadores de filtro solar comumente empregados, como: octocrileno, metilbenzilideno cânfora, dietilexil 2,6-naftalato, poliéster-8 e fluido de silicone fotoestabilizante são substâncias receptoras de energia do estado excitado tripleto. São desenvolvidos para que o estado excitado tripleto de um doador foto-instável possa ser extinto antes que reações fotoquímicas destrutivas ocorram. Estudos recentes mencionam antioxidantes de origem vegetal com a função adicional de fotoestabilização (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020). Na Técnica de Transferência de Energia de Förster (FRET), o mais frequente é a inibição do estado de energia singleto-singleto entre uma substância doadora no estado excitado e uma receptora no estado fundamental, portanto, neste caso, o filtro solar atuaria como molécula doadora e o antioxidante a receptora (LAKOWICZ, 2006). Pode ser usada para escolher o melhor antioxidante nas formulações fotoprotetoras, uma vez que para

favorecer a fotoestabilidade dos filtros solares, inibindo o estado de energia singleto ou tripleto de moléculas fotoinstáveis (KAWAKAMI *et al.*, 2017).

A extinção do estado excitado singleto pode oferecer algumas vantagens importantes. Por exemplo, a extinção de um cromóforo, enquanto está em seu estado de excitação singleto, reduz as substâncias no estado excitado tripleto, onde a maioria das reações fotoquímicas destrutivas tem origem. Além disso, o cromóforo extinto estará disponível para absorver outro fóton em um período menor (BONDA, 2008).

As teorias para transferência de energia desenvolvido por Förster, ou seja, mecanismo de Coulombic e de troca de Dexter, relacionam as taxas de transferência de energia da substância doadora para a substância receptora no estado excitado singleto. Por meio da sobreposição da área de um gráfico da emissão de fluorescência da substância doadora com o espectro de absorção da substância receptora é possível avaliar a probabilidade das substâncias doadoras e receptoras serem energeticamente compatíveis. A teoria de Förster e de Dexter afirmam que quanto maior a sobreposição, maior a taxa de energia transferida. A diferença entre as duas teorias é que a primeira relata que a magnitude do coeficiente de extinção é importante enquanto na segunda não (BONDA, 2008).

Existem técnicas usadas para prever se uma substância pode auxiliar os filtros químicos na absorção e dissipação dessa energia. A natureza nos fornece uma conveniente ferramenta para medir a extinção do estado singleto, esta é a fluorescência, que nada mais é que a emissão de um fóton do estado excitado singleto. Emissões aproximadamente entre 400 e 800 nm são visíveis ao olho humano. As menores que 400 nm e maiores que 800 nm podem ser lidas por instrumentos como o fluorômetro, que mede as emissões de fluorescência, visualizando a probabilidade de extinção pelos mecanismos de Coulombic ou de troca. No que tange os fotoprotetores, a intenção é evitar reações fotoquímicas, ou seja, com a extinção do estado excitado singleto, o tripleto é evitado, assim como as reações fotoquímicas (KAWAKAMI *et al.*, 2017; BONDA, 2008).

Os filtros solares químicos são excitados após absorção da radiação ultravioleta. Após excitação, a molécula retorna para o estado fundamental e parte dessa energia é convertida em calor, luz visível e/ou fluorescente. Alguns filtros têm dificuldade em retornar rapidamente ao estado fundamental e, portanto, diminuem a sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta. Existem técnicas usadas para prever se uma substância pode auxiliar esses filtros químicos na absorção e dissipação dessa energia. Essas substâncias são conhecidas como fotoestabilizantes (KAWAKAMI *et al.*, 2017; BONDA, 2008).

Estudos recentes mencionam antioxidantes de origem vegetal com a função adicional de fotoestabilização (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020). A Técnica de Transferência de Energia de Förster (FRET) é um fenômeno eletrodinâmico, o mais frequente na inibição do estado de energia singleto-singleto. FRET ocorre entre uma molécula doadora no estado excitado e uma molécula aceitadora no estado fundamental, portanto, neste caso, o filtro seria a molécula doadora e o antioxidante seria a molécula aceitadora (LAKOWICZ, 2006).

Essa técnica pode ser usada para escolher o melhor antioxidante nas formulações fotoprotetoras, uma vez que para favorecer a fotoestabilidade é necessário inibir o estado de energia singleto ou tripleto das moléculas fotoinstáveis (KAWAKAMI *et al.*, 2017).

2.8.5. Avaliação da atividade antioxidante na pele e em membrana biológica alternativa

Muitos métodos *in vitro* são citados na literatura para detectar a ação antioxidante de certas substâncias na pele, como o método do β -caroteno, inibição do radical DPPH, ABTS, Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC), utilizando Fluoresceína como um marcador fluorescente, Poder Antioxidante com Redução Férrica (FRAP), ensaio CUPRAC e Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Recomenda-se a descrição do potencial antioxidante de compostos utilizando maior variedade de ensaios *in vitro* (MARTINS *et al.*, 2020; SILVA, MICHNIAK-KOHN, LEONARDI, 2017a).

Muitos trabalhos têm sido registrados na literatura científica que avalia o comportamento do estresse oxidativo do estrato córneo por fitas adesivas ou sistema de modelo de pele, medidos pelos métodos 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ou espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de *tape stripping* foi aplicada para avaliar a atividade antioxidante *ex vivo* do ácido ferúlico e etossomas carregados com rutina pelo método DPPH (CANDIDO *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2020).

Dentre estas técnicas destacamos a Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Lohan *et al.* (2015) demonstraram nesta técnica, a formação de radicais sob irradiação com luz infravermelha e visível na pele humana foi reduzida com o tempo devido à absorção oral e à aplicação tópica de antioxidantes. Lund *et al.* (2007) descreveram o desenvolvimento de um ensaio EPR que usou a fotogeração do radical reativo de melanina como uma medida da penetração da luz ultravioleta nos melanócitos *in situ* na pele humana. Estudos com pele humana aproximam os resultados do local onde serão aplicados os medicamentos e cosméticos, mas considerações éticas, cuidados com a preservação e disponibilidade dificultam seu uso. Em alguns casos, membranas sintéticas ou culturas de pele equivalentes

são usadas (RIGGY & BARRY, 1990; SCHMOOK, MEINGASSNER, BILLICH, 2001). Portanto, pele de animal, como rato sem pêlo, camundongo, guiné, porco-orelha, coelho e ecdise de pele de cobra podem ser usadas como uma alternativa (NGAWHIRUNPAT *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

De acordo com Ribeiro (2019), a demanda por produtos produzidos de forma ética, que defendam o direito dos animais e busquem uma vida mais sustentável, está movendo o mercado em uma nova direção. Foi estimado que 4% da população brasileira, cerca de 7,6 milhões de pessoas são vegetarianas, muitas delas, veganas. Diante do exposto, a escolha pela ecdise de cobra (EC) é a mais conveniente, pois pode ser obtida em abundância sem a morte do animal. A ecdise de cobra ocorre regularmente no animal adulto, a cada 2 a 3 meses, portanto, uma única ecdise de cobra pode fornecer várias amostras e seu uso pode ser considerado ecologicamente correto (BABY *et al.*, 2008; BALOGH, 2011; TAKAOKA *et al.*, 2010).

A ecdise de cobra (EC) é composta pelo estrato córneo e fornece uma barreira semelhante ao estrato córneo humano, incluindo a espessura da membrana, sua estrutura protéica (queratina tipo α e β) e composição lipídica. A pele de cobra descartada não tem folículos capilares, portanto, problemas associados à rota de penetração transfolicular, que podem ser significativos em peles de mamíferos, podem ser evitados. O fato de não conter tecidos vivos (epiderme viável) não apresenta tendência à degradação microbiológica, o que facilita seu armazenamento e prolonga seu prazo de validade para uso (BABY *et al.*, 2008; BALOGH *et al.*, 2010; HAIGH, BEYSSAC, AIACHE, 1998; RIGGY & BARRY, 1990; TAKAOKA *et al.*, 2010; WIDLER, SIGRIST, GAFNER, 2002). Abdel-Aal, Mansori, Zahouani (2017) em um estudo comparativo da resposta de fricção de EC e pele humana, concluíram que a ecdise de pele de cobra é altamente compatível com a pele humana, apesar das diferenças na estrutura da superfície e topologia. A epiderme humana é semelhante à camada da epiderme da ecdise de pele de cobra.

2.8.6. Estudos de eficácia de ingredientes ativos com membrana biológica (ecdise de pele de cobra)

Vários estudos avaliaram a penetração, permeação e absorção transdérmica de medicamentos e ingredientes cosméticos em ecdise de pele de cobra como em Ngawhirunpat *et al.* (2006), que avaliou a permeação transdérmica *in vitro* de fármacos hidrofílicos e lipofílicos utilizando EC de *Elaphae obsoleta* e pele humana. Eles concluíram que o coeficiente de permeabilidade dos fármacos lipofílicos foi o mesmo para ambas as

membranas biológicas. A espessura e o conteúdo lipídico da EC e da pele humana foram significativamente iguais, sugerindo o uso de ecdise de pele de cobra como membrana barreira para estudos de absorção percutânea *in vitro* de compostos lipofílicos.

Kouchak & Handali (2014), avaliou *in vitro* a absorção transdérmica da aminofilina por meio de EC utilizando células de difusão de Franz e investigou a influência de vários potenciadores na permeação transepidérmica do fármaco. Eles concluíram que o tipo e a concentração dos intensificadores podem influenciar o processo. Oliveira *et al.* (2010) avaliaram o efeito do óleo de copaíba como promotor de permeação do ácido kójico em células de difusão de Franz com membrana de pele de cobra de *Crotalus durissus terrificus*. Concluíram que o óleo de copaíba a 25 e 50% tinham a capacidade de promover a penetração do ácido kójico.

Baby *et al.* (2008) avaliaram a estabilidade cutânea *in vitro* e a penetração da rutina em uma emulsão cosmética, usando um modelo alternativo com a biomembrana de *Crotalus durissus*. De acordo com os resultados, a emulsão não favoreceu a penetração cutânea da rutina, mas apenas sua retenção no estrato córneo de *Crotalus durissus*.

Praça, Medina, Bentley (2015) avaliaram a pele de cobra brasileira (*Crotalus durissus terrificus*) como modelo substituto de membrana biológica para ensaios de fármacos de permeação cutânea *in vitro* e encontraram muitas semelhanças nas taxas de permeação entre o estrato córneo humano e a pele de cobra. Itoh *et al.* (1990) avaliaram o uso de ecdise de pele de cobra como um modelo de membrana para estudos de penetração percutânea *in vitro* em comparação com a pele humana. A permeabilidade de vários compostos e a contribuição de vários grupos funcionais para a permeabilidade, também, foram considerados semelhantes entre a ecdise de pele de cobra e a pele humana. Além disso, a permeabilidade dos compostos através da ecdise de pele de cobra foi aumentada pela azona, um dos promotores de penetração transdérmica mais extensivamente estudados.

Kuramoto *et al.* (1996) avaliaram as características de permeabilidade da EC à indometacina e álcoois graxos. O fluxo de álcoois graxos na ecdise de pele de cobra foi maior do que o relatado na pele humana e a EC teve atividade semelhante à estearase da pele humana. Takahashi *et al.* (2001) avaliaram a influência do pH na permeabilidade de *p*-toluidina e aminopirina através de ecdise de pele de cobra como modelo de membrana. A partir desses resultados, as espécies ionizadas de *p*-toluidina foram transportadas através da EC, mas as espécies ionizadas de aminopirina não.

Harada *et al.* (1993) avaliaram a permeabilidade *in vitro* do ácido salicílico em pele humana, de roedores e de cobra. Eles descobriram que o EC e a pele de rato sem pêlos tinham

permeabilidade semelhante à pele de peito e coxa humana. Riggy & Barry (1990) avaliaram a EC e a pele de camundongo sem pêlos como membranas modelo durante estudos de permeação como substitutos da pele humana. Considerando as semelhanças entre a ecdise de pele de cobra e a pele humana, facilidade de armazenamento e manuseio e baixo custo, a EC pode oferecer um bom modelo de membrana para estudos transdérmicos.

Alguns estudos avaliaram a hidratação e o bronzeamento artificial de ingredientes cosméticos em pele de ecdise de cobra, como Takaoka *et al.* (2010), que avaliou a interação de compostos hidratantes ativos na biomembrana de *Crotalus durissus* por meio de calorimetria diferencial de varredura e espectroscopia RAMAN. Eles sugeriram que os ingredientes hidratantes têm a segurança necessária, pois não alteraram de forma marcante a estrutura do estrato córneo. A solução orgânica de silício e o gel hidrofílico com uréia apresentaram melhor poder hidratante. Balogh *et al.* (2011) eles estudaram fórmulas de bronzeamento artificial usando ecdise de pele de cobra como modelo de membrana alternativo.

2.8.7. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A radiação ultravioleta B favorece o surgimento de radicais livres na epiderme, enquanto a radiação ultravioleta A diminui os níveis de antioxidantes, inativa enzimas antioxidantes e aumenta os marcadores detectáveis de peroxidação lipídica na pele (POPOV *et al.*, 2009; HERRLING *et al.*, 2003). As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) favorecem o estresse oxidativo celular, peroxidação lipídica, liberação de fosfolípidos de membrana, danos diretos e indiretos ao DNA associados com a carcinogênese e formação de prostaglandinas, vinculadas aos processos inflamatórios. Além da formação de radicais induzidos por fatores externos como a radiação ultravioleta, luz visível, infravermelho e xenobióticos, existe a formação de radicais endógenos, presentes naturalmente em reações bioquímicas e fisiológicas, como: espécies radicais de oxigênio, superóxido (O₂⁻), radical oxigênio singlete (1O₂), hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), etc (POPOV *et al.*, 2009; DARVIN *et al.*, 2010). Sob condições normais, a quantidade de radicais é equilibrada por enzimas e antioxidantes. O aumento excessivo na produção de ROS está envolvido, por exemplo, na gênese de doenças, como: câncer, diabetes mellitus, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide e lesão por isquemia (POPOV *et al.*, 2009).

O uso de antioxidantes de origem natural, são empregados em medicamentos e em cosméticos com benefícios diversos, estudos recentes têm avaliado sua ação na fotoestabilidade de filtros solares (YAGER *et al.*, 2019, PERES, 2015). Como os compostos

fenólicos que são conhecidos por sua ação antioxidante. Kanski e colaboradores (2001), verificaram por EPR a ação protetora do ácido ferúlico contra radicais livres em culturas com células neurais. Fabris e colaboradores (2008) verificaram por meio das técnicas de EPR e DSC que os estilbenos Resveratrol e piceídeo, atuaram na prevenção e controle da peroxidação lipídica em micelas e lipossomas. Outras técnicas como avaliação da atividade antioxidante por inibição do radical DPPH• são relatadas na literatura. Kikuzake *et al.* (2002) e Gulçin (2010) avaliaram a atividade antioxidante do ácido ferúlico e Resveratrol, respectivamente, por inibição do radical DPPH•.

A pele é considerada um material ideal para investigações por EPR, devido sua espessura relativamente fina e localização superficial no corpo que está em contato direto com os raios ultravioleta, os quais são formadores dos radicais livres. Com a incidência de radiação de micro-ondas na frequência de 1 a 10 GHz é possível entrar profundamente na pele, de 1 a 35 mm, e monitorar a penetração dos estabilizadores de radicais livres ou sonda magnética por imagens de EPR (POPOV *et al.*, 2009). Os espectros de centros paramagnéticos fornecem indiretamente informações sobre microambiente local e funções da pele, assim como em tecidos subcutâneos com lesões, como nos tumores (GÓMEZ *et al.*, 2011).

Os nitróxidos têm sido usados em EPR *in vivo*, pois são suscetíveis a presença de oxigênio, espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistemas biológicos redox (reações de oxiredução). Uma sonda magnética desejável de nitróxido deve ter alta capacidade de atravessar o estrato córneo da pele, responsável pelo efeito barreira, e reagir moderadamente com as EROs, resultando em diminuição do sinal, sendo considerado um método não invasivo. A literatura menciona que lesões como fotoenvelhecimento, câncer e lesão hepática por tetracloreto de carbono retardam o decaimento dos sinais EPR de nitróxidos (BURLAKA *et al.*, 2019).

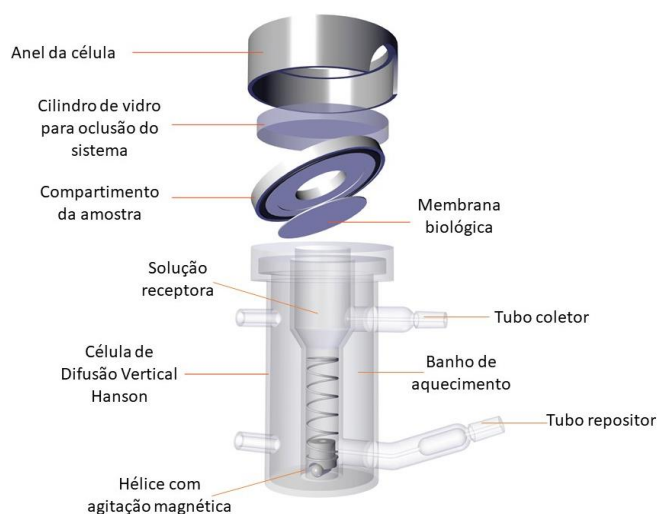
Uma observação pertinente desta técnica é o grau de hidratação do material, que dificulta a penetração das micro-ondas, pois a molécula de água absorve 2GHz interferindo na leitura de EPR (GÓMEZ *et al.*, 2011). Neste contexto, verifica-se que esta é a principal limitação do método aplicado a estudos biológicos, sendo importante a escolha do tipo de pele, como a opção da pele de cobra que possui menor teor de água em relação a da orelha de porco, sendo considerada membrana biológica ideal para a técnica de EPR (PONGJANYAKUL *et al.*, 2002).

2.8.8. Penetração e Permeação cutânea

O ensaio de permeação cutânea em estudos com produtos fotoprotetores visa avaliar sua segurança, ou seja, se os filtros solares permanecerem na superfície da pele reduzirá a probabilidade de chegarem na corrente sanguínea (FREITAS *et al.*, 2015; HAYDEN *et al.*, 2005). Os filtros solares químicos têm sido usados por várias décadas, mas sua segurança, eficácia e perfil toxicológico ainda não estão claros. Há uma preocupação crescente sobre as possíveis consequências prejudiciais da exposição de EHMC, BMBM e outros filtros químicos, considerando sua permeação e a possibilidade de ocorrer absorção e interferência no sistema endócrino. Tal comportamento pode interferir na eficácia fotoprotetora do fotoprotetor e na segurança de uso do produto (KLIMOVA, HOJEROV, BERANKOV, 2015; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

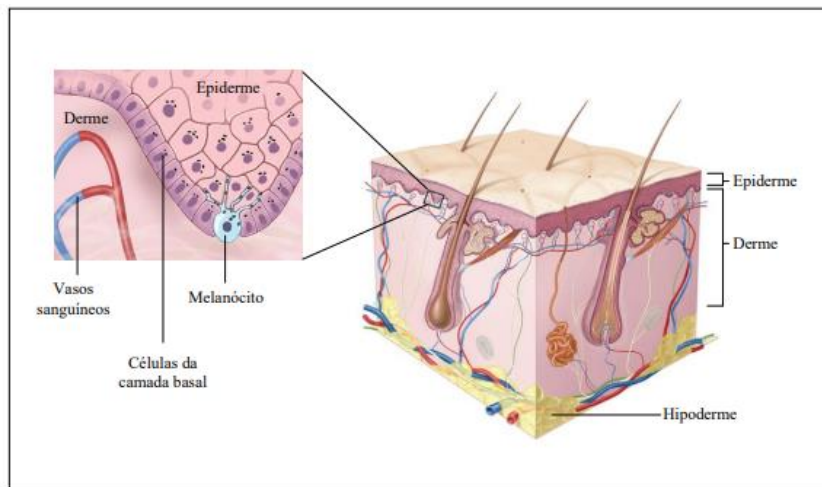
O método mais comum aplicado em estudos de permeação cutânea é o por difusão estática em células de Franz, que envolve um doador superior e uma câmara receptora inferior (contendo fluido receptor) separado por uma membrana como a pele (**Figura 6**). O fluido receptor está em contato permanente com parte da derme e pode extrair componentes da pele ou produzir modificações fisiológicas na mesma (**Figura 7**). Normalmente, a CLAE é empregada na quantificação de ingredientes ativos, avaliando a penetração e/ ou permeação do composto na pele e sua presença nas amostras de fluido receptor. Pode haver dificuldade de detecção devido a degradação potencial do ingrediente ativo aplicado na pele, decorrente das enzimas presentes (ALONSO *et al.*, 2017).

Figura 6. Representação esquemática de célula de difusão vertical de Franz.



Fonte: Adaptado de Hanson Research. Disponível em: <https://hansonresearch.com/news/page/5/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

Figura 7. Representação das camadas da pele. Com destaque para a localização do melanócito que se encontra na camada basal da epiderme.



Fonte: Adaptado de National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>. Acesso em 12 ago. 2018.

Referente a permeação dos ingredientes ativos através da pele a partir do veículo, este deve primeiro se difundir para fora do veículo e depois para a superfície da pele. As características que influenciam no processo de permeação envolvem a massa molar e a lipofilicidade. Componentes mais lipofílicos podem penetrar mais no estrato córneo. O estrato córneo é muito mais permeável a moléculas neutras do que íons de ácidos ou bases (DRAELOS, 2010).

O coeficiente de partição para compostos entre estrato córneo (ESC) e água ($\log P_{SC/água}$) pode ser estimado pela equação $(-0,024 + 0,59 \log P_{octanol/água})$. Esta fórmula indica que a partição do ingrediente ativo no estrato córneo, a partir de uma solução aquosa, está diretamente relacionada com sua lipofilicidade. O estrato córneo é predominantemente lipofílico e muito resistente, desta forma, componentes na forma molecular podem possuir facilidade de penetração no estrato córneo (CANTO, 2016; HUNG *et al.*, 2008).

O EHMC possui coeficiente de partição ($\log P_{octanol/água} = 5,65$) (PAESE, 2008) e o BMBM 4,68 (CHATELAIN, GABARD, SURBER, 2003). O AF possui $\log P_{octanol/água} = 1,67$ (PERNIN *et al.*, 2019). A forma não iônica ou molecular do Resveratrol (**RES**) possui alta lipofilicidade, visto seu coeficiente de partição ($\log P_{octanol/água} = 3,32$). Valores de $\log P_{octanol/água} > 0$ favorecem a retenção dos componentes no estrato córneo, pois são substâncias com maior afinidade por componentes oleosos, como no caso dos filtros solares **EHMC** e **BMBM** e os antioxidantes **AF** e **RES** (CANTO, 2016; HUNG *et al.*, 2008). Os

ensaios de permeação cutânea são mais específicos na avaliação da retenção de ingredientes ativos nas camadas da pele.

Para elaboração do ensaio de permeação cutânea foi escolhida a pele de porco por ser semelhante a pele humana e por ser um método *in vitro* aceito e validado internacionalmente (SCCS/1628/21, 2021; PESCIA *et al.*, 2012; JIMÉNEZ *et al.*, 2004; SCCNFP/0119/99, 1999). Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products. Plenary Session of 23 June 1999 com a orelha de porco, submetemos o projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme **Anexo I**. Por se tratar de material oriundo pós abate do animal em frigorífico, o CEUA apenas tomou ciência e nos cedeu o ofício.

As características que influenciam na permeação do ingrediente ativo são as físico-químicas, como a massa molar e a lipofilicidade. É sabido que componentes mais lipofílicos podem penetrar mais no estrato córneo. Também, existem boas evidências de que o estrato córneo é muito mais permeável a moléculas neutras do que a íons de ácidos ou bases. A forma não iônica ou molecular do Resveratrol mostra alta lipofilicidade de acordo com o coeficiente de partição ($\log P_{\text{octanol}/\text{água}} = 3,32$). O coeficiente de partição para compostos entre SC e água ($\log P_{\text{SC}/\text{água}}$) pode ser estimado $= -0,024 + 0,59 \log P_{\text{octanol}/\text{água}}$. Esta fórmula indica que a partição do ativo no estrato córneo a partir de uma solução aquosa está diretamente relacionada à sua lipofilicidade. O estrato córneo é principalmente de natureza lipofílica e muito mais resistente, portanto, o Resveratrol na forma molecular pode possuir facilidade de penetração no estrato córneo. No que diz respeito à permeação dos ativos através da pele a partir do veículo, um componente ativo deve primeiro se difundir para fora do veículo e depois para a superfície da pele (HUNG *et al.*, 2008). Hung *et al.* (2008) avaliou a permeação do Resveratrol por meio da difusão em células de Franz em membrana de pele de rato e de celulose. Os autores utilizaram soluções tampões no meio receptor com valor de pH 6 a 10,8 e observaram que houve aumento da ionização conforme elevou-se o valor de pH. Desta forma, o ensaio de penetração e permeação cutânea para fotoprotetores multifuncionais é conveniente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a fotoestabilização dos filtros químicos *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (EHMC) e *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (BMBM) associados aos antioxidantes Resveratrol e ácido ferúlico quando isolados ou incorporados na forma de emulsão.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificação das alterações moleculares provocadas pela radiação UV nas soluções com filtros solares (**BMBM** e **EHMC**) e nas soluções com os filtros solares (**BMBM** e **EHMC**) e **AF** ou **RES** por ^1H RMN quantitativo;
- Utilização de técnicas termoanalíticas: Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG) para avaliar possíveis interações químicas e comportamento térmico entre os filtros solares isolados e com a adição dos antioxidantes;
- Análise qualitativa da supressão do estado energético singlete dos filtros orgânicos em solução verificando se ocorre o retorno para o estado energético fundamental, relacionado com a fotoestabilidade do filtro solar;
- Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) oferecerá meios para a investigação das relações espaciais entre moléculas;
- Teste de Estabilidade Preliminar e Normal das formulações desenvolvidas incorporadas com filtros solares e antioxidantes para escolha daquela de melhor desempenho.
- Avaliar a eficácia fotoprotetora e a fotoestabilidade *in vitro* das formulações fotoprotetoras associadas aos antioxidantes Ácido Ferúlico ou Resveratrol;
- Ressonância paramagnética eletrônica (EPR) *ex vivo* para avaliar a redução de EROs;
- Validação bioanalítica para o ensaio de penetração/ permeação cutânea;
- Avaliar a penetração/ permeação cutânea por célula de difusão de Franz em orelha de porco para estimar a segurança dos filtros solares

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. *Matérias-primas (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)/ Grau de pureza farmacêutico:*

- *Ammoniumacryloyl-dimethyltaurate/vp copolymer*
- *Butyl Methoxydibenzoylmetane* (Fagron, pureza=98,2%)
- *Caprylic/capric triglyceride*
- *Cetearyl alcohol (and) dicetyl phosphate (and) ceteth-10 phosphate*
- *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (Fagron, pureza=98,6%)
- *Ferulic Acid* (GAMMA, pureza=98,6%)
- *Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethyl-paraben (and) butylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben*

- *Propylene glycol*
- Resveratrol (Active Pharmaceutica, pureza= 99,8%)

Outros

- Água ultrapura Milli-Q[®]

4.1.2. Solventes e reagentes

Reagentes grau de pureza cromatográfico

- Metanol Merck[®]

Reagentes grau de pureza analítica (P.A.)

- 2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl (DPPH•) (Sighma-aldrich, teor de pureza 97,0%)
- 3-(Carboxy)-2,2,5,5- tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (PCA) (Sighma-aldrich, purity 99,94%)
- Acetato de etila (Alpax)
- Albumina bovina fração V (Inlab, teor de pureza=98%)
- Benzoato de feniletila (ISP)
- Cloreto de sódio (Fagron)
- Clorofórmio-d6 (Merck, teor de pureza 99,8%)
- Dimetilsulfóxido- d6 (DMSO) ampolas (CIL 99,9%)
- Dimetilsulfona (Aldrich)
- Etanol absoluto (Synth)
- Fosfato monobásico de sódio (Synth)
- Hidróxido de sódio (Synth)
- Indian metallic standard (HITACHI, pureza=99,94%)
- Tetrametilsilano (TMS)

4.1.3. Padrões de referência

- *Butyl Methoxydibenzoilmetano* (Fagron, teor de pureza=98,2%)
- *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (Fagron, teor de pureza=98,6%)
- *Ferulic Acid* (GAMMA, teor de pureza=98,6%)
- *Resveratrol* (Active Pharmaceutica, teor de pureza= 99,8%)
- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox[®]) (Sighma-aldrich, teor de pureza 97,0%)

4.1.4. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos – Marca: IKA[®], Modelo: Vortex Genius 3
- Agitador magnético com chapa de aquecimento – Marca: Ika[®], Modelo: C-MAG HS7
- Agitador mecânico com hélice dentada, Marca: Fisatom, Modelo: 713DS
- Balança analítica – Marca: Shimadzu[®], Modelo: AUX220
- Balança semi-analítica – Marca: Mettler[®], Modelo: P – 120
- Banho termostatizado – Marca: Nova Ética[®], Modelo: 11103/01
- Bomba de vácuo – Marca: Fischer Scientific[®], Modelo: Maximadry
- Célula de alumínio, Marca: dpUnion[®]
- Células de Difusão vertical, orifício de 15mm (área de difusão do compartimento doador), Marca: Hanson.

Acessórios:

- Seringa de vidro de precisão de 10mL, Marca: Hanson
- Placa agitadora e suporte para 6 células de Franz, Marca: Variomag
- Centrífuga– Marca HITACHI[®], Modelo Himac CF-RNseries
- Cromatofolha com indicador de fluorescência- Merck[®]
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência–Marca:Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T

Acessórios:

- Desgaseificador - Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Bomba- Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Módulo de Comunicação - Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Amostrador - Marca Shimadzu[®], Modelo SIL-20AHT
- Detector de fluorescência - Marca Shimadzu[®], Modelo JPD-M20A
- Detector DAD - Marca Shimadzu[®], Modelo JPD-M20A
- Coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) – Shimadzu[®]
- DSC 7020 e TG/DTA 7200, Marca: Hitachi, Modelo: Exstar
- EPR EMX PLUS, Marca: Bruker[®]
- Espectrofotômetro UV-Vis – Marca: Thermo Scientific[™], Modelo Evolution 600, com cubetas de quartzo caminho ótico de 1cm.
- Espectrômetro RMN, Marca: Bruker, Modelo: DPX300 - Rheinstetten/Karlsruhe, Germany.

Acessório:

- Sonda multinuclear de 5mm e frequência de 300,13 MHz
- Espectrofluorímetro, Marca: Shimadzu[®], Modelo: RF-5301PC

- Espectrofotometro, Marca: Labsphere , Modelo: UV2000S
- Estufa – Marca Ethik technology[®], Modelo 402/3N
- Fita adesiva, Marca: Scotch[®] 3M 12x33mm
- Microtubo para centrifugação de 1,5mL – Marca: Merck[®]
- Filtro para seringa de nylon 0,45µm e 13mm – Marca: Allcrom[®]
- Filtro para seringa de nylon 0,45µm e 25mm – Marca: Allcrom[®]
- pHmetro digital de bancada - Marca Digimed[®], Modelo: DM22
- placa de polimetilmetacrilato (PMMA), Marca: Helioplate[®], Modelo: HD6
- Purificador de água – Marca Gehaka[®], Modelo OS10LX
- Refrigerador – Marca Consul
- Simulador solar, Marca: Suntest[®] CPS +, Modelo: Atlas, Germany
- Sistema Purificação de Água MilliQ[®], Marca: Simplicity[®], Mod. Ultrapure Water Type 1
- Softwares: RFPC[®], Minitab[®] 17 version, LC Solution[®] e Origin[®]
- Termômetro de infravermelho (-38° C a+365 °C), Marca: Scan Temp
- Tubos falcon 15 e 50mL Marca: Cralplast

4.2. Métodos

4.2.1. Alterações moleculares nos filtros orgânicos por ¹H RMN

Com intuito de verificar a influência da presença dos antioxidantes Resveratrol (**RES**) e ácido ferúlico (**AF**) nas alterações moleculares da associação dos filtros químicos **BMBM** e **EHMC** ocasionadas pela radiação UV, avaliaram-se as variações espectrais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio, antes e após a irradiação dos filtros em solução isolados ou combinados (MURPHY *et al.*, 2020; MITURI & MARTINCIGH, 2008).

O solvente deuterado escolhido foi o dimetilsulfóxido por ser aprótico e polar, empregado segundo a literatura para ingredientes cosméticos e ativos farmacêuticos. Os antioxidantes **AF** e **RES** são solúveis neste solvente (MURPHY *et al.*, 2020; PINTO, 2014). As amostras dos filtros diluídas com DMSO-*d*₆ foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho ótico de 1cm e irradiadas no simulador solar Suntest[®] CPS + (Atlas, Germany), utilizando filtro Daylight por 2, 4 e 6h (dose total de 13.211 KJ.m⁻²) e irradiância de 760 W.m⁻². A literatura cita bons resultados com o antioxidante rutina usando a dose inferior de 5.760 J.cm⁻² e neste trabalho empregou-se dose maior com a intenção de visualizar possivelmente mais alterações moleculares.

Os espectros de ^1H RMN para determinação quantitativa dos filtros foram obtidos em espectrômetro Bruker (Rheinstetten/Karlsruhe, Germany), DPX300, usando uma sonda multinuclear de 5mm e operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz. A metodologia foi desenvolvida e validada anteriormente (PINTO, 2014).

Os parâmetros da análise quantitativa foram: pulso de 30° , tempo de pré-aquisição de 5 μ seg, tempo de relaxação de 10 segundos e total de 32 varreduras, tetrametilsilano (TMS) como referência interna de deslocamento químico e temperatura da sonda de 30°C durante a análise. O processamento dos dados foi efetuado por meio da transformada de Fourier com um filtro de exponencial de 0,3Hz. A fase e a linha base foram ajustados manualmente, bem como a integração dos sinais, evitando-se a integração dos picos satélites do ^{13}C . Por razões estatísticas, a análise foi feita em triplicata (BATISTA *et al.*, 2008). Destacado em vermelho nas moléculas a posição dos hidrogênios que foram quantificados por RMN (**Figura 1 e 2**).

a) Preparação das amostras

Mistura dos filtros UV (BMBM e EHMC) com o antioxidante AF ou RES

Foram pesados exatamente cerca de 240 mg de **BMBM**; 480mg de **EHMC** e 30 mg de **AF** ou **RES** e transferidos para cubeta de quartzo de 3,0 mL. Foram adicionados na cubeta 60 mg de dimetilsulfona, utilizado como padrão interno PI. De acordo com Pinto (2014), o padrão interno deve ser de baixo custo, quimicamente estável e inerte, disponível na forma pura, não higroscópico, solúvel na maioria dos solventes e resultar em um sinal na forma de singlete que não deve sobrepor ao sinal da substância a ser quantificada. Após, adicionou-se o DMSO- d_6 e homogeneizou-se. Para a quantificação, transferiram-se alíquotas de 0,5 mL para tubos analíticos de RMN para a análise (**Tabela I**), nos tempos pré-estabelecidos, antes e após exposição à radiação.

Tabela I. Soluções avaliadas quanto a alterações moleculares frente à radiação UV.

<i>Identificação da solução</i>	Concentração em mg.mL⁻¹				
	BMBM	EHMC	AF	RES	PI
1	240,0	480,0	-	-	60,0
2	240,0	480,0	30,0	-	60,0
3	240,0	480,0	-	30,0	60,0

Legenda: **BMBM** = *Butyl Methoxydibenzoylmethane*; **EHMC** = *Ethylhexyl Methoxycinnamate*; **AF** = *Ferulic Acid*; **RES** = *Resveratrol*; **PI** = padrão interno (dimetilsulfona); - = não adicionada.

Na análise dos espectros, antes e após a exposição à radiação UV, observaram-se as alterações ocorridas nas moléculas dos filtros **EHMC** e **BMBM**, como isomerização e tautomerização. A razão entre os isômeros **EHMC** (trans/cis) e tautômeros **BMBM** (enol/ceto) das moléculas dos filtros foram calculados utilizando-se a **Equação 1** (HOLZGRABE *et al.*, 2005).

$$K = \frac{\% \text{ filtro não modificado}}{\% \text{ filtro modificado}} \quad (1)$$

Legenda: **K** = contante de equilíbrio

4.2.2. Avaliação quantitativa das amostras por RMN quantitativo (qRMN)

A análise foi realizada em espectrômetro Bruker (Rheinstetten/Karlsruhe, Germany), DPX300, usando uma sonda multinuclear de 5 mm e operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz. Para a análise quantitativa os parâmetros usados foram: pulso de 30°, tempo de pré-aquisição de 5 µseg, com um tempo de relaxação de 10 seg e um total de 32 varreduras, tetrametilsilano (TMS) como referência interna de deslocamento químico e temperatura da sonda de 30 °C na análise. O processamento dos dados foi efetuado por meio da transformada de Fourier com um filtro de exponencial de 0,3Hz. A fase e a linha base foram ajustadas manualmente, bem como a integração dos sinais, evitando-se a integração dos picos satélites do ¹³C. Por razões estatísticas, a análise foi feita em triplicata (BATISTA *et al.*, 2008).

A intensidade do sinal do padrão interno de referência, dimetilsulfona, foi comparada a área do sinal do analito **Equação 2** (BATISTA *et al.*, 2008, WELLS *et al.*, 2002).

$$\frac{m(a)}{m(PI)} = \frac{A(a)}{A(PI)} \times \frac{N(PI)}{N(a)} \times \frac{M(a)}{M(PI)} \times (PI) \text{ pureza} \quad (2)$$

Legenda: **m(a)** - massa do analito; **m(PI)** - massa do padrão interno; **A(a)** - área do sinal do analito; **A(PI)** - área do sinal do padrão interno; **N(PI)** - número de núcleos hidrogênios presentes no sinal do padrão interno; **N(a)** - número de núcleos de hidrogênios presentes no sinal do analito; **M(a)** - massa molar do analito; **M(PI)** - massa molar do padrão interno e **(PI)** - pureza do padrão interno, 98,0%.

4.2.3. Análise térmica

Os estudos termoanalíticos foram realizados com os antioxidantes e os filtros químicos (**EHMC**) e (**BMBM**) isolados ou combinados. Adicionalmente, misturas binárias contendo o antioxidante com cada um dos filtros **EHMC** ou **BMBM**; mistura dos dois filtros (**EHMC** e **BMBM**) e a ternária (**EHMC**, **BMBM** e um dos antioxidantes).

a) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas empregando-se célula de alumínio hermeticamente fechada por ser de uso comum (AUROUX, 2013), contendo massa entre 2,0 a 3,0 mg; atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), razão de aquecimento $10,0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura entre 25 e $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ em equipamento DSC 7020. A célula DSC foi calibrada com padrão índio metálico, teor 99,94% ($T_{\text{fusão}}=156,6^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}}=28,7\text{ Jg}^{-1}$) (ARAUJO, 2009; BROWN & GALLAGHER, 2011).

b) Termogravimetria (TG)

As curvas TG do estudo do comportamento térmico dos filtros **BMBM** e **EHMC** e dos antioxidantes, além das misturas dos filtros e combinações com antioxidantes foram obtidas com uma termobalança, entre $30,0$ e $600,0^{\circ}\text{C}$, atmosfera dinâmica de N_2 ($100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinho de Pt e massas de amostra em torno de 5 mg em equipamento TG/DTA 7200 (ARAUJO, 2009; BROWN & GALLAGHER, 2011). As curvas termogravimétricas derivadas (DTG) foram plotadas para melhor visualização dos resultados obtidos nas curvas TG.

4.2.4. Análise qualitativa da supressão do estado energético singlete por fluorescência

A análise qualitativa da supressão do estado energético singlete do **BMBM** e do **EHMC** foi realizada por meio da observação da fluorescência apresentada pelas soluções dos filtros, em metanol, isolados ou combinados com os antioxidantes, **AF** ou **RES**. O benzoato de feniletila foi utilizado como controle negativo (**Tabela II**). As soluções ($10\text{ }\mu\text{L}$) foram transferidas para uma cromatofolha com indicador de fluorescência, revestida com silicagel. Os filtros foram imobilizados e a leitura foi realizada sob fonte de 365 nm . A resposta foi considerada positiva quando as amostras que apresentaram intensidade da fluorescência decrescente entre si e menor que o controle negativo (HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010). A leitura comparativa foi realizada conforme **Figura 8**.

Figura 8. Distribuição das amostras dos filtros em solução de metanol na cromatofolha para avaliação qualitativa da supressão do estado de energia singlete pelos antioxidantes **AF** e **RES** (PINTO, 2014).

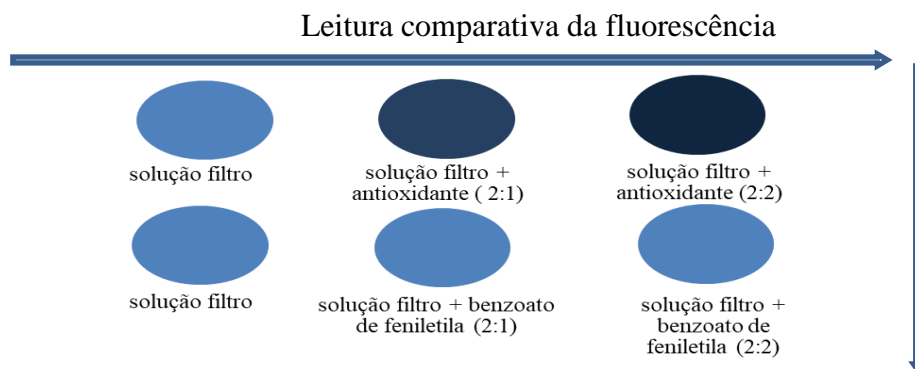


Tabela II. Soluções dos filtros **BMBM** e **EHMC** adicionados ou não de **AF** e **RES**.

Identificação da solução	Quantidade adicionada (mg.mL ⁻¹)				
	BMBM	EHMC	AF	RES	benzoato de feniletila
solução teste 1	2,0	-	-	-	-
solução teste 2	2,0	-	1,0	-	-
solução teste 3	2,0	-	2,0	-	-
controle negativo 4	2,0	-	-	-	1,0
controle negativo 5	2,0	-	-	-	2,0
solução teste 6	2,0	-	-	1,0	-
solução teste 7	2,0	-	-	2,0	-
solução teste 8	1,0	1,0	-	-	-
solução teste 9	1,0	1,0	1,0	-	-
solução teste 10	1,0	1,0	2,0	-	-
controle negativo 11	1,0	1,0	-	-	1,0
controle negativo 12	1,0	1,0	-	-	2,0
solução teste 13	1,0	1,0	-	1,0	-
solução teste 14	1,0	1,0	-	2,0	-

Legenda: **BMBM** = *Butyl Methoxydibenzoylmethane*; **EHMC** = *Ethylhexyl Methoxycinnamate*; **AF** = Ácido ferúlico; **RES** = Resveratrol; - = não adicionada.

4.2.5. Triagem de antioxidantes com potencial fotoestabilizador por *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET)

Os experimentos de extinção de fluorescência foram obtidos no Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, software RFPC, utilizando soluções de **BMBM** e **EHMC** em acetato de etila; 100 µL de **EHMC** e 100 µL de solução estoque **BMBM** (0,83mg/ mL) foram transferidos, cada um, para uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e 3 mL de volume, em seguida foram transferidos 1,8 mL de acetato de etila. O comprimento de onda de excitação de **EHMC** foi fixado em 310 nm e o comprimento de onda de excitação de **BMBM** foi fixado em 360 nm. Os espectros de emissão foram então registrados em uma faixa espectral de 220 a 700 nm.

O experimento de absorção foi obtido no Espectrofotômetro UV Vis – Thermo Scientific™, modelo Evolution 600. 1mL da solução estoque de **RES** (0,95mg/ mL) foi transferido para frasco volumétrico de 10 mL, em seguida 750 µL desta solução foram transferidos para frasco volumétrico de 10 mL e para uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de 3mL. 1mL da solução estoque de **AF** (0,95mg/ mL) foi transferido para frasco volumétrico de 10 mL, em seguida 500 µL desta solução foi transferido para frasco volumétrico de 5 mL e para uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de 3mL. Os espectros de absorção foram registrados em uma faixa espectral de 200 a 400 nm. Todas as medições foram realizadas a $25,0 \pm 2,0$ °C. O espectro foi obtido pela sobreposição entre o espectro de absorção e emissão do doador e do aceitador, respectivamente (KAWAKAMI, 2017).

4.2.6. Desenvolvimento das formulações

Foram formuladas emulsões base óleo em água (O/A) (**Tabela III**) variando a concentração do agente de consistência (Bases **A1** e **B1**) com os antioxidantes escolhidos **AF** 1% ou **RES** 3%, com a adição dos filtros solares orgânicos **BMBM** 5,0% (p/p) e **EHMC** 10,0% (p/p), com objetivo de avaliar, posteriormente, a influência destes na eficácia fotoprotetora *in vitro*. Foi utilizada concentração usual de cada antioxidante registrada na literatura (PERES *et al.*, 2018; PERETTI *et al.*, 2015, FAGRON, 2019). A concentração de uso dos filtros químicos respeitou o limite preconizado pela RDC N° 69, de 23 de março de 2016 (BRASIL, 2016). O componente **1** da **Fase A** foi hidratado com **2** e **3** sob agitação. Após homogeneização, as **Fases A** e **B** foram aquecidas a 75 °C em chapa de aquecimento Ika® (C-MAG HS7). A **Fase B** foi vertida lenta e constantemente sobre **A**, sob agitação de 1000 rpm, em agitador mecânico Fisatom (713DS), com hélice dentada. A **Fase C**

(conservante e antioxidantes) foram adicionados quando o sistema atingiu 40 °C (BABY, 2007; PRISTA, ALVES, MORGADO, 1995). Acondicionaram-se as formulações à temperatura ambiente.

Tabela III. Composição quali e quantitativa das formulações fotoprotetoras para incorporação dos antioxidantes.

Item	Componentes / *INCI Name	Função	Proporção % p/p	
			A1	B1
FASE A				
1.	Co-polímero do ácido sulfônico acrilóil-dimetilauratoevinilpirrolidona neutralizado/ <i>Ammoniumacryloyl-dimethyltaurate/vpcopolymer*</i>	Doador de consistência/ formador de filme	0,5	1,0
2.	Propilenoglicol/ <i>Propylene glycol*</i>	Solubilizante	5,0	10,0
3.	Água deionizada/ <i>Acqua*</i>	Veículo	q.s.p.100,0	
FASE B				
4.	Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílicoetoxilado (10 OE)/ <i>Cetearylalcohol (and) dicetylphosphate (and) ceteth-10 phosphate*</i>	Emulsificante aniônico	6,0	10,0
5.	Triglicérides de ácido cáprico e caprílico/ <i>Caprylic/caprictriglyceride*</i>	Emoliente	3,5	10,0
6.	BMBM / <i>Butyl Methoxydibenzoilmetano*</i>	Filtro solar químico UVA	5,0	5,0
7.	EHMC / <i>Ethylhexyl Methoxycinnamate*</i>	Filtro solar químico UVB	10,0	10,0
FASE C				
8.	Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno/ <i>Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) butylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben*</i>	Conservante de amplo espectro	0,7	0,7
9.	Resveratrol/ <i>Resveratrol</i> e/ou Ácido ferúlico/ <i>Ferulic acid</i>	Antioxidante	(-)	

4.2.7. Avaliação da Estabilidade Preliminar

As formulações, preparadas em triplicata, foram submetidas a *Avaliação da Estabilidade Preliminar*, empregando o teste de centrifugação e estresse térmico, após 48 h do preparo. O objetivo foi identificar processos de instabilidade como cremeação, sedimentação,

floculação e separação de fases, adicionalmente às propriedades organolépticas consideradas inadequadas, segundo critérios do formulador e, também, mencionadas na literatura (BABY, 2007; BRASIL, 2004).

a) Características Organolépticas

As formulações foram avaliadas quanto à homogeneidade e cor, comparativamente com a emulsão base sem adição dos antioxidantes (BABY, 2007; BRASIL, 2004), de acordo com a nomenclatura abaixo:

- **HOMOGENEIDADE**

N – Normal, sem alterações (homogêneo)

LM – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases)

M – Modificado (alterações caracterizadas de separação de fase)

- **COR**

N – Normal, sem alterações (manteve a cor inicial sem alterações)

LM – Levemente Modificada (apresentou leve modificação visual)

M – Modificada (apresentou intensa modificação visual)

Os resultados permitiram avaliar a estabilidade macroscópica das formulações. As condições experimentais que as amostras foram submetidas são:

b) Centrifugação

Aproximadamente 10g de cada formulação foram submetidas a centrifugação em centrífuga HITACHI® Himac CF-RNseries durante 30min, a 3000rpm (210G) (BABY, 2007; BRASIL, 2004).

c) Estresse térmico

Aproximadamente, 10g de cada formulação foram transferidas para tubos de vidro e levados ao banho termostático Nova Ética® 11103/01. O ensaio foi realizado entre 40,0 e 80,0 °C, com elevação de 10,0 em 10,0 °C e mantendo-se as amostras por 30 min em cada valor de temperatura. As formulações foram mantidas em repouso e avaliadas após atingirem a temperatura ambiente (BABY, 2007; BRASIL, 2004).

4.2.8. Avaliação da Estabilidade Acelerada

As formulações aprovadas na *Avaliação de Estabilidade Preliminar*, com cor e aspecto homogêneo foram submetidas a *Avaliação da Estabilidade Acelerada*, com o intuito de verificar o surgimento de sinais de instabilidade nas formulações, como separação de fases.

As alterações foram classificadas conforme o **item 4.2.7**. Foram submetidas aos ciclos gela-degela de 24 horas a $45,0 \pm 2,0$ °C e 24 horas a $5,0 \pm 2,0$ °C, por 12 dias (seis ciclos no total). As amostras foram acondicionadas em potes de vidro com capacidade de 30,0g, triplicata (BRASIL, 2004).

4.2.9. Avaliação da Estabilidade Normal (AEN)

Após a realização da *Avaliação da Estabilidade Acelerada* prosseguiu-se para a *Avaliação da Estabilidade Normal* para verificar possíveis alterações de aspecto, cor e odor, assim como alteração de pH e perda da funcionalidade. As amostras foram acondicionadas em potes de vidro com capacidade de 30,0g em triplicata (BRASIL, 2004) e expostas nas condições ambientais:

- temperatura elevada (estufa): $45,0 \pm 2,0$ °C;
- temperatura baixa (geladeira): $5,0 \pm 2,0$ °C;
- temperatura ambiente, sob influência da radiação solar indireta ($22,0 \pm 2,0$ °C).

As análises foram iniciadas após 48 horas de preparação das amostras, tempo inicial (**t₀**) e ao final do período estabelecido para cada condição (**t_{final}**). Avaliações: características organolépticas homogeneidade e cor, como descrito anteriormente, e parâmetros físico-químicos e funcionais.

a) Características Organolépticas

Conforme item **4.2.7.a**.

b) Parâmetro físico-químico - pH

O valor de potencial de hidrogênio (pH) foi determinado por potenciometria, pela imersão do eletrodo de vidro de calomelano do pHmetro Digimed DM22, adequado para emulsões, previamente calibrado. Realizaram-se as análises (triplicada) à temperatura ambiente $20,0 \pm 2,0$ °C (BRASIL, 2008).

c) Caracterização da Eficácia Fotoprotetora *in vitro*

As formulações adicionadas com **RES** e **AF** nas práticas de 3,0 e 1,0%, respectivamente, foram submetidas à AEN (3 meses), nas condições: $45,0 \pm 2,0$ °C; $5,0 \pm 2,0$ °C e $22,0 \pm 2,0$ °C (exposição à radiação solar indireta). As preparações foram caracterizadas quanto à eficácia fotoprotetora *in vitro*, utilizando espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração conforme descrito a seguir: alíquotas foram aplicadas

uniformemente na forma de um filme de $1,3\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$, em movimentos circulares na superfície do substrato de polimetilmetacrilato (PMMA) (Helioplate[®] HD6) e deixadas secar por 30min. em temperatura ambiente $25,0\pm 2,0$ °C. O branco foi a placa de PMMA com glicerina.

Os valores espectrofotométricos de transmitância foram registrados entre 290 e 400nm e registros a cada 1,0nm em espectrofotômetro de esfera difusa Labsphere[®] UV200S. Foi considerada a média das leituras de três placas para cada amostra, com 9 leituras em pontos diferentes para cada placa, considerando o coeficiente de variação máximo entre os pontos de 20%. Os parâmetros tomados foram FPS *in vitro*, λ_c e razão UVA/ UVB (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011; DIFFEY *et al.*, 2000). O FPS foi calculado de acordo com a **Equação 3**.

$$\text{FPS} = \frac{\sum_{250\text{nm}}^{450\text{nm}} S(\lambda)EA(\lambda)}{\sum_{250\text{nm}}^{450\text{nm}} S(\lambda)EA(\lambda)T(\lambda)} \quad (3)$$

Legenda: $S(\lambda)$ – Irradiância Solar Spectral; $EA(\lambda)$ – eritematogenicidade spectral de CIE (*Comission Internationale de l' Eclairage*); $T(\lambda)$ – Transmitância spectral da amostra.

Comprimento de onda crítico (λ_c)

Comprimento de onda crítico (λ_c) foi calculado de acordo com a **Equação 4**.

$$\lambda_c = \frac{\sum_{\lambda=250}^{\lambda=\lambda_c} A(\lambda)}{\sum_{250\text{nm}}^{\lambda=450} A(\lambda)} \quad (4)$$

Legenda: $A(\lambda)$ – Absorbância spectral da amostra.

d) Fotoestabilidade de formulações fotoprotetoras

As formulações que apresentaram resultados de FPS ≥ 15 e comprimento de onda crítico ≥ 370 nm no teste de eficácia fotoprotetora *in vitro*, foram submetidas à avaliação de fotoestabilidade. As amostras selecionadas foram irradiadas com dose de $901,5 \text{ kJm}^{-2}$, irradiância 500 Wm^{-2} , faixa de 300 e 800 nm, padronizada por radiômetro em Simulador solar Suntest[®] CPS + Atlas, Germany. A determinação dos parâmetros de eficácia fotoprotetora (FPS *in vitro*, λ_c e relação UVA/ UVB) foi realizada antes e após a exposição à irradiação das amostras conforme descrito no **item 4.2.7**. em Espectrofotometro Labsphere UV2000S para determinar a influência dos antioxidantes na fotoestabilização da mistura do filtro.

O tratamento estatístico dos resultados antes e pós irradiação na mesma condição ambiental e tempo, em dias, foi feito pelo Teste *t-student* para duas médias para cada formulação. Além disso, foi aplicada a ferramenta de análise de variância (ANOVA) seguida

do teste de Tukey para todos os resultados antes e pós irradiação na mesma condição ambiental e tempo, em dias, comparando todas as formulações (**BF**, **BF+RES**; **BF+AF**). Foi utilizado o programa Minitab®, versão 17.

e) **Quantificação dos filtros solares (BMBM e EHMC) por qRMN nas formulações fotoprotetoras no decorrer da AEN**

Para a quantificação simultânea dos filtros **BMBM** e **EHMC** em formulações fotoprotetoras no decorrer da avaliação da estabilidade normal (AEN), foram pesados exatamente cerca de 0,8 g das formulações e adicionado 1,0 mL de CDCl_3 . A mistura foi submetida por 5 min em agitador com vórtex, e centrifugada por 15 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o restante foi transferido para balão volumétrico de 1,0 mL. Foi adicionado 20,0 mg de dimetilsulfona, utilizada como padrão interno (PI), o volume foi completado com clorofórmio deuterado (CDCl_3) e transferido para tubos analíticos de RMN, em seguida a análise foi efetuada em espectrômetro Bruker DPX300 - Rheinstetten/Karlsruhe, Germany.

4.2.10. Atividade antirradicalar

O método utilizado para avaliar a atividade antirradical dos antioxidantes isolados e das formulações foi a redução do radical 2,2-difenil-1-picri-hidrazil (DPPH^{\bullet}) em solução de metanol. A solução com este radical possui uma cor roxa com absorção máxima entre 515-528 nm, que foi alterada pela redução do radical e permite monitoramento espectrofotométrico com Espectrofotômetro UV Vis-Thermo® Evolution 600 UV-VIS.

As formulações foram solubilizadas em metanol na concentração de $0,1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, centrifugadas a 5000 rpm por 15 min. Uma alíquota, 0,5 mL, do sobrenadante foi adicionada em 2,5 mL de DPPH^{\bullet} ($100\mu\text{M}$) e homogeneizada, mantida em temperatura ambiente ($20,0 \pm 2,0$ °C) ao abrigo da luz por 20min. Após esse período, a redução do radical livre DPPH^{\bullet} foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 517 nm. O controle negativo consistiu em DPPH^{\bullet} ($100\mu\text{M}$) em metanol (branco). Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do radical DPPH^{\bullet} de acordo com a **Equação 5** (BALOGH, 2011; BRAND-WILLIAMS, BONDET, BERSET, 1997; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI, SAURA-CALIXTO, 1998; BABY, 2007).

$$\% \text{ de inibição do } \text{DPPH}^{\bullet} = \frac{AA - AAm}{AA} \cdot 100 \quad (5)$$

Legenda: **AA**: Absorbância do controle negativo; **AAm**: Absorbância da amostra; **DPPH**: 2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox[®] equivalente, um derivado da vitamina E muito utilizado como antioxidante padrão em métodos de avaliação de atividade antioxidante (DARIO, BABY, VELASCO, 2015; THAIPOONG *et al.*, 2006). Assim, tornou-se necessária a construção de curva analítica que se correlaciona ao %SRL e concentração desse padrão. Exatamente 20mg de Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) foram pesados em balança analítica e diluídos em balão volumétrico de 100,0ml com metanol, obtendo-se solução de concentração de 800 μ M. A partir dessa solução, foram preparadas diluições seriadas, obtendo-se soluções de concentrações finais de 3; 13; 32; 64; 97; 129; 160; 192, 222 e 277 de Trolox[®] em μ M (OLIVEIRA, 2021).

Alíquotas de exatamente de 0,5ml de cada concentração de Trolox[®] foram transferidas para tubos de ensaio, em triplicata. Em seguida, adicionaram-se exatamente 2,5ml de solução etanólica de DPPH^{*} 100 μ M, seguindo-se o método descrito anteriormente. Os valores obtidos foram utilizados para construção da curva analítica, sendo que a equação da reta (determinada pelo método dos mínimos quadrados) e o valor do coeficiente de determinação (r^2) obtidos no software Excel[®].

4.2.11. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) *ex vivo*

Nesta técnica de avaliação atividade antirradicalar é o grau de hidratação do material, que pode dificultar as medidas do EPR, pois as moléculas de água absorvem as microondas, interferindo na leitura do EPR (GÓMEZ *et al.*, 2011). Nesse contexto, é uma limitação importante deste método aplicado a estudos biológicos, sendo importante a escolha do tipo de pele, como a pele de cobra que apresenta menor teor de água em relação à orelha de porco ou outros tipos, sendo considerada uma membrana biológica ideal para a técnica de EPR (PONGJANYAKUL *et al.*, 2002).

a) Preparação de ecdise de pele de cobra (EC)

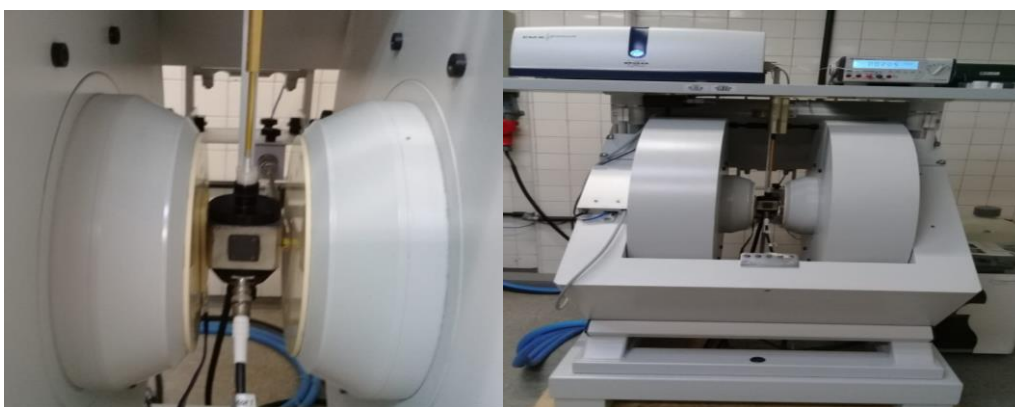
A ecdise da pele de cobra da espécie *Crotalus durissus Rattle* foi doada pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantã, com a ciência de seu uso pelo Comitê de Ética no Uso de Animais com a carta nº 034.2020. Foi lavado duas vezes com água destilada para retirada de muco e sujeira, após serem adicionados em papel absorvente para secagem (BABY, 2007; BALOGH 2011). Em seguida, fragmentos padronizados da região ventral de EC foram cortados.

Para permitir a penetração da armadilha EPR giratória (3- (Carboxy) -2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi - PCA), foi utilizado fita adesiva (Scotch®), uma por biópsia para facilitar a penetração do PCA (DARVIN *et al.*, 2010). O PCA é um radical livre do tipo nitróxido que é reduzido à hidroxilamina correspondente quando reage com uma ROS (ALBRECHT *et al.*, 2016). Biópsias de pele de cobra descartada com aproximadamente 1,00 cm² de área e 0,080 mm de espessura foram incubadas em solução de PCA [0,1 mM em solução 50/50 de água/etanol (v/v)] por 20 min em um copo de vidro com tampa. As formulações foram aplicadas na proporção de 2 mg.cm⁻² nas biópsias de EC, espalhando-as o mais uniformemente possível.

b) Parâmetros EPR

As biópsias foram acomodadas sem dobras no fundo do tubo de quartzo para EPR com 10mm de diâmetro, em seguida este foi posicionado no equipamento conforme **Figura 9**. Os espectros EPR foram medidos na banda X, equipamento EMX PLUS da Bruker®, tempo de conversão de 9,64 ms, amplitude de modulação 4 G (0,4 mT), campo central de 3470 G (347 mT), janela de varredura de 1000 G (100 mT) e 10 números de varreduras com uma temperatura ambiente de 20,0 ± 2,0 °C. O valor de pico a pico do espectro foi usado para avaliação da intensidade do sinal. A intensidade do sinal é proporcional ao número de radicais livres presentes na amostra.

Figura 9. Local de posicionamento do tubo de quartzo para EPR com a amostra no equipamento e imagem do equipamento na íntegra.



Fonte: obtido pelo autor.

c) Fluxograma do experimento

Fluxograma dos experimentos para as medidas de EPR.



Legenda: **EPR** - *Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy*; **UV** – Radiação Ultravioleta.

d) Leitura de EPR antes e após a irradiação UV

O sinal inicial do EPR foi medido antes e após a etapa de irradiação UV, ambos à temperatura ambiente de $20,0 \pm 2,0$ °C (DARIO, BABY, VELASCO, 2015). Para garantir a homogeneidade da dose irradiada, as amostras foram irradiadas entre duas placas de quartzo. A dose total de radiação foi de $1,378\text{KJ}/\text{m}^2$ ao longo de 30 min, irradiada no simulador solar Suntest® CPS⁺. O intervalo de tempo foi registrado para avaliar a possível queda do sinal, principalmente após a irradiação UV (**Tabela IV**).

Tabela IV. Detalhes das medidas: ecdise de pele de cobra (isolada), com base creme e com base fotoprotetora UVB/UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxydibenzoylmethano* 5,0% p/p) aditivadas ou não com *Ácido Ferúlico* 1,0% p/p or Resveratrol 3,0% p/p, antes e após a irradiação.

tempo (dia)	Duração de medidas (entre as análises/ min)	Medidas (amostras)
1	48	1 ^a - Não Irradiado (NIR)
	50	2 ^a - Irradiado (IR) por UV
	35	3 ^a - Irradiado (IR) por UV (decaimento de sinal)
	20	4 ^a - Irradiado (IR) por UV (decaimento de sinal)
3	45	5 ^a - Irradiado (IR) por UV (decaimento de sinal)

Legenda: **NIR**: Não Irradiado; **IR**: Irradiado; **UV**: Radiação Ultravioleta

4.2.12. Validação do método bioanalítico

a) Identificação e quantificação dos filtros BMBM e EHMC na base fotoprotetora na ausência ou na presença dos antioxidantes AF ou RES

As condições cromatográficas para o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas na determinação e identificação da concentração dos filtros solares **BMBM** e **EHMC**.

A fase móvel foi composta por água ultrapura (MilliQ-Millipore): metanol (12:88). O fluxo foi de 0,8 ml/min, volume de injeção de 10 µl, detecção a 325 nm, temperatura de 25,0±1,0 °C, em cromatógrafo da Shimadzu® LC-20AD/T, Detector DAD, coluna C18 Shimadzu®, (150 mm x 4,6 mm x 3µm) (GARCIA, 2019).

b) Linearidade

A linearidade de um método consiste na proporcionalidade direta dos resultados obtidos com a concentração do analito presente na amostra a ser analisada, dentro dos limites de variação (ICH, 2005; USP, 2013, BRASIL, 2003).

Neste trabalho, a linearidade foi avaliada no intervalo de concentração de 1,0 a 80,0 µg/mL de **BMBM** e no intervalo de concentração de 1,0 a 150,0 µg/mL de **EHMC** em metanol. Foram avaliadas cinco concentrações em triplicada. A obtenção do cálculo da equação da reta se deu por regressão linear (BRASIL, 2017; BRASIL, 2003; BABY, 2007; ICH, 2005; USP, 2013).

c) Precisão e Exatidão

A precisão avalia o grau de concordância dos resultados obtidos quando tomadas várias amostragens de uma mesma amostra. Considera-se a repetibilidade intra-dia, curto período de tempo com o mesmo analista e mesmo laboratório e a repetibilidade inter-dia (precisão intermediária), que representou a variabilidade dos resultados em dias diferentes de análise (USP, 2013).

A precisão e a exatidão foram avaliadas por meio da repetibilidade intradia e interdias. Expressas como desvio padrão relativo (DPR) na **Equação 6**. Três concentrações foram avaliadas em triplicata: 28,75; 38,75 e 48,75µg/ml para **BMBM** e 57,50; 77,50 e 97,50µg/ml para **EHMC**. As amostras foram analisadas no mesmo dia para repetibilidade intradia e em três dias diferentes para a repetibilidade interdias.

$$\text{DPR}(\%) = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (6)$$

Legenda: *DP* - desvio padrão; *CMD* - concentração média determinada = média das 3 determinações; *DPR* - desvio padrão relativo.

d) Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação simultânea foi avaliado a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao limite de detecção, conforme a **Equação 7** (BRASIL, 2017).

$$\text{LQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{IC}} \quad (7)$$

Legenda: **IC**: inclinação da curva de calibração; σ : desvio padrão do intercepto com o eixo Y.

e) Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção e o limite de quantificação correspondem a menor concentração de uma amostra a ser detectada (BRASIL, 2003; USP 2013).

O limite de detecção do método foi estimado baseado nos resultados dos cálculos de regressão linear de três curvas de calibração que foram construídas com as concentrações próximas ao limite de quantificação, sendo expresso pela **Equação 8** (BRASIL, 2017):

$$\text{LD} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{\text{IC}} \quad (8)$$

Legenda: **IC**: inclinação da curva de calibração; σ : desvio padrão desvio padrão do intercepto com o eixo Y.

f) Determinação da condição *sink* e líquido receptor da mistura de filtros solares

Foi avaliada a condição *sink* por meio da quantificação dos filtros isolados em combinação com as soluções receptoras: tampão fosfato pH = 7,4 + 4% albumina bovina e tampão fosfato pH = 7,4 + 4% albumina + 20% etanol. Os erlenmeyers foram aquecidos a 37 °C sob agitação de 200rpm, por 24h. Em um erlenmeyer foi adicionado BMBM (10mg), **EHMC** (20mg) e 6mL de tampão fosfato pH = 7,4 + 4% albumina bovina. Em outro erlenmeyer foi adicionado **BMBM** (10mg), **EHMC** (20mg) e 6mL de tampão fosfato pH = 7,4 + 4% albumina bovina +20% etanol. Após 24h foram retiradas alíquotas de 1mL de cada Erlenmeyer, sendo transferidas para um balão de 25mL e completado com metanol

(triplicata). A concentração teórica final de **BMBM** foi de 66µg/mL dentro da curva de calibração que vai de 1 a 80µg/mL. A concentração teórica final de **EHMC** foi de 132µg/mL dentro da curva que vai de 1 a 150µg/mL.

g) Recuperação dos filtros solares

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos valores experimentais com os considerados verdadeiros. O resultado deve ser o mais próximo de 100% calculado por meio da **Equação 9** (BRASIL, 2003, USP, 2013, RIBANI *et al.*, 2004).

$$E(\%) = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad (9)$$

Legenda: *E* - Exatidão; *CME* - Concentração Média Experimental; *CT* - Concentração Teórica.

Foi realizado o ensaio de recuperação por meio da adição de solução dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** em concentrações conhecidas definidas como baixa (CQB), concentrações médias (CQM) e concentrações altas (CQA) em presença da solução receptora com base fotoprotetora (**BF**) e pele de orelha de porco (**EPI+DERME**). Solução com padrão secundário dos filtros solares (SP1): foram pesados 50mg de **BMBM** e 100mg de **EHMC**, em seguida transferidos para balão volumétrico de 100ml e completado com metanol. Foram transferidos 10mL da solução com padrão secundário dos filtros solares (SP2) para balão volumétrico de 25mL, após foi completado com metanol. Com concentração teórica final de 200µg/mL para **BMBM** e 400µg/mL para o **EHMC**.

As soluções receptoras com base fotoprotetora (**BF**) e pele de orelha de porco (**EPI+DERME**) foram aquecidas a 37,0±2,0 °C, sob agitação de 200rpm por 24h em Erlenmeyer com 6ml de líquido receptor. Após esse período, foi coletado 1ml e transferido para um balão volumétrico de 10ml, após foi completado com metanol (balão A).

Para obter a recuperação de CQB foi transferido 1,5mL do balão A para balão volumétrico de 10 mL com 0,5 mL da solução padrão (SP2) (balão B) e completado com metanol, após foi filtrado em filtros de 0,45µm de poro com 25mm de diâmetro, transferido para 3 vials e analisado por CLAE. Concentração teórica do padrão secundário do padrão de referência secundário de 10µg/mL para o **BMBM** e 20µg/mL para o **EHMC**. A concentração teórica final (amostra + padrão de referência secundário) foi 28,75µg/mL para o **BMBM** e 57,50 µg/mL para o **EHMC**.

Para obter a recuperação de CQM foi transferido 1,5mL do balão A para balão volumétrico de 10mL com 1,0mL da solução padrão (SP2) (balão B) e completado com metanol, após foi filtrado em filtros de 0,45µm de poro com 25mm de diâmetro, transferido para 3 vials e analisado por CLAE. Concentração teórica do padrão de referência secundário de 20µg/mL para o **BMBM** e 40µg/mL para o **EHMC**. Concentração teórica final (amostra + padrão de referência secundário) de 38,75µg/mL para **BMBM** e 77,50 µg/mL para **EHMC**.

Para obter a recuperação de CQA foi transferido 1,5ml do balão A para balão volumétrico de 10mL com 1,5mL da solução padrão (SP2), balão B, e completado com metanol, após foi filtrado em filtros de 0,45µm de poro com 25mm de diâmetro, transferido para 3 vials e analisado por CLAE. Concentração teórica do padrão secundário de referência de 30µg/mL para **BMBM** e 60µg/mL e de para **EHMC**. A concentração teórica final (amostra+ padrão de referência secundário) foi 48,75µg/mL - **BMBM** e 97,50 µg/mL - **EHMC**.

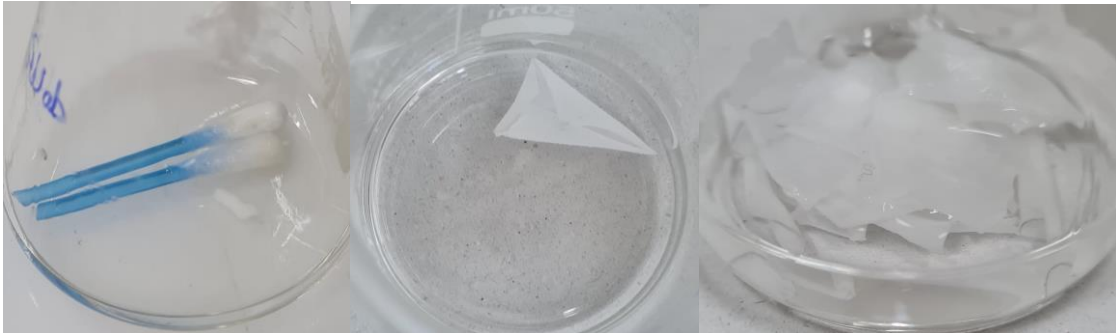
Foi considerada adequada a recuperação dos padrões secundários dos filtros solares contida na faixa de 80-120% (FDA, 2018).

h) Avaliação da retenção de filtros solares no estrato córneo por *tape stripping*

A técnica de *tape stripping* baseia-se na remoção progressiva do EC pela aplicação sequencial de fitas adesivas na área onde a formulação foi aplicada, seguida da extração das substâncias ativas retidas nas fitas (**Figura 10**), com posterior determinação por método validado.

Ao final do experimento de permeação (24 horas), o excesso de formulação presente na superfície da membrana foi delicadamente removido com auxílio de 2 hastes de 1 *swab*, em seguida, as peles foram retiradas da célula de difusão. Na área exposta à difusão o EC foi retirado por meio da aplicação de fitas adesivas transparente mágica Scotch® 3M sobre esta área. Foram aplicadas 15 fitas medindo 1,5x1,0cm de forma sucessiva, sendo que a primeira fita foi quantificada separadamente devido a possibilidade de ainda conter excesso de formulação. A quantidade de fita a ser utilizada na técnica (14 fitas) foi padronizada com base na remoção total do EC, indicada pelo brilho na face exposta da pele (FREITAS, 2013; LOPES *et al.*, 2010; VICENTINE *et al.*, 2009).

Figura 10 – Fotos das 2 hastas do swab, 1ª fita e 14 fitas restantes do *tape stripping*.



i) Avaliação da retenção dos filtros solares na epiderme viável + derme

Após a retirada do EC, como descrito anteriormente, a área de permeação foi recortada, picotada e os fragmentos de pele (**Figura 11**), epiderme viável + derme (**EPI+DERME**) foram transferidos para tubos falcon, os quais foram adicionados 6ml de metanol, após foram imersos na solução extratora e agitados em vórtex por 5 min. Em seguida, os tubos foram deixados em banho de ultrassom por 5 min para romper as células e extrair as substâncias em estudo. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtros de 0,45um de poro com 25mm de diâmetro e analisadas por CLAE.

Figura 11 – Alíquotas da epiderme viável+derme fragmentadas.



Fonte: obtido pelo autor.

j) Seletividade: pesquisa de interferentes

A seletividade analítica do método para as substâncias em estudo havia sido avaliada. Portanto, nesta etapa, foi realizada a avaliação da seletividade bioanalítica por meio da pesquisa de picos interferentes. Para tal, foram analisadas as amostras: solução receptora

escolhida (tampão fosfato pH 7,4 + 4% de albumina bovina); solução receptora com os filtros **BMBM** e **EHMC**; solução receptora com o creme base (**CB**); solução receptora com a base fotoprotetora (**BF**), solução receptora com base fotoprotetora e Resveratrol (**BF+RES**); solução receptora com base fotoprotetora e ácido ferúlico (**BF+AF**); solução receptora com 15 fitas adesivas (**FA**); fragmentos de (**EPI+DERME**); 14 fitas adesivas com o **EC** e solução receptora com pele de orelha de porco (**EPI+DERME**). As amostras foram aquecidas a $37,0 \pm 2,0$ °C, sob agitação de 200rpm por 24h. Foi coletado 1ml e transferido para um balão volumétrico de 10ml, após foi completado com metanol (balão A). Em seguida, foi transferido 1,5ml do balão A para o balão B e completado com metanol, após foi filtrado em filtros de 0,45µm de poro com 25mm de diâmetro, transferido para 3 vials e analisado por CLAE.

4.2.13. Avaliação da Penetração e Permeação cutânea na orelha de porco

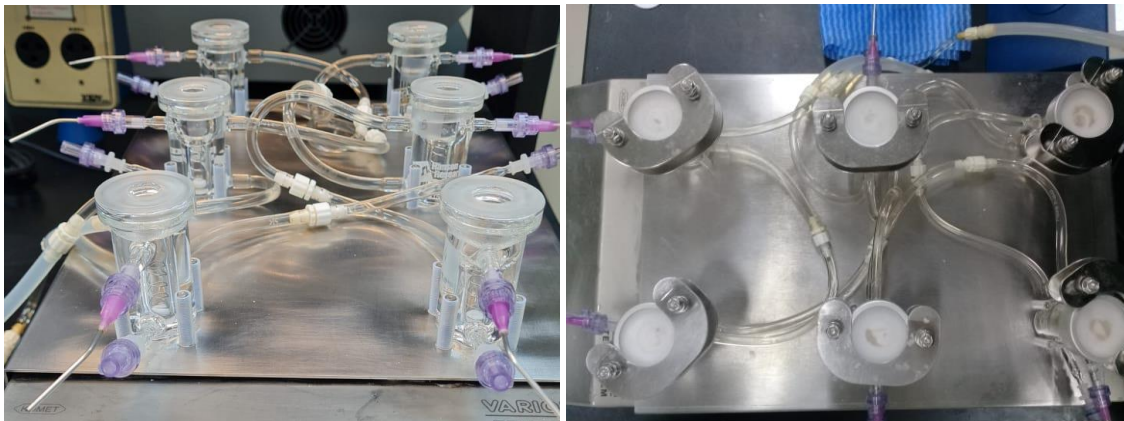
Foram realizados ensaios para avaliar a liberação *in vitro* dos filtros solares **BMBM** e **EHMC**. Estes em células de difusão vertical de dois compartimentos (células de Franz), de acordo com procedimento recomendado pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION, 2008) e formulário nacional NF31 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013), conforme descrito em *Pharmacopeia Forum* (2009) para produtos tópicos (semi-sólidos) e transdérmicos com modificações.

Para este estudo, foi utilizada a pele de orelha de porco limpa com água corrente e detergente neutro, após a cartilagem subcutânea foi removida. O experimento obteve ciência da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) por se tratar de material biológico oriundo de frigorífico, número de Processo 553. A pele foi congelada a $-5,0$ °C e utilizada uma semana depois (PAEPE, ROSEEUW, ROGIERS, 2002).

A relação dose/ área aplicada na pele corresponde a $2\text{mg}/\text{cm}^2$, de acordo com a literatura (SCHALKA & REIS, 2011). Alíquotas de 150mg da base fotoprotetora contendo **BMBM** e **EHMC** (**BF**), **BF+AF** e **BF+RES** foram aplicadas na superfície da pele. Foi colhida amostra no tempo t4h e t24h. O líquido receptor utilizado foi tampão fosfato pH 7,4 + 4% de albumina bovina (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015; UNITED STATES 1997), este foi transferido para banho aquecido a $37,0$ °C (camisa da célula de Franz), sob constante agitação com mini barra magnética (**Figura 12**). A solubilidade das substâncias no fluido receptor foi verificada antes do experimento. A concentração dos filtros **BMBM** e **EHMC** foi identificada e quantificada em 6 diferentes compartimentos: Tampa de vidro e

acrílico, Swab, 1ª Fita, 14 Fitas, Epiderme+Derme (**EPI+DERME**) e Fluido Receptor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 12. Montagem do sistema com células de difusão de Franz.



Fonte: obtido pelo autor.

4.2.14. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA one-way) seguido do Teste de Múltipla Comparação de Tukey, quando apropriado, Teste T (*student*) para duas médias utilizando o *software MiniTab*[®] 17 1.0 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Alterações moleculares nos filtros orgânicos avaliadas por ¹H qRMN

A análise quantitativa das alterações moleculares pela radiação UV nos filtros **BMBM** e **EHMC** em solução de DMSO-*d*₆ e a comparação desses resultados com a adição do **AF** e **RES** são apresentados na **Tabela V** e nas **Figuras 13 a 15**.

Na **Figura 13** estão apresentados os espectros ¹H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC**. A solução contendo os filtros **BMBM** e **EHMC** apresentaram menor razão *trans/cis* e *enol/ceto* conforme aumento de dose, denotando sua perda de eficácia pós irradiação. Após a dose de irradiação de 13211 J.cm⁻², a razão *trans/cis* para o **EHMC** foi 3,96 e a razão *enol/ceto* foi de 9,31 para o **BMBM**. A não conservação da forma *trans* para o **EHMC** e *enol* para **BMBM** compromete a eficiência de absorção da radiação ultravioleta dos filtros solares. Conforme maior for o valor da razão maior será a fotoestabilidade. Os sinais gerados pelos hidrogênios selecionados para a quantificação pelo método relativo geraram sinais em 4,72 e 7,18 ppm para as formas cetônica e enólica do **BMBM** respectivamente e 5,83 e 6,44 para as formas *cis* e *trans* do **EHMC** respectivamente (PINTO, 2004, MTURI & MARTINCIGH, 2008; PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001). Murphy *et al.* (2020) obteve a leitura de

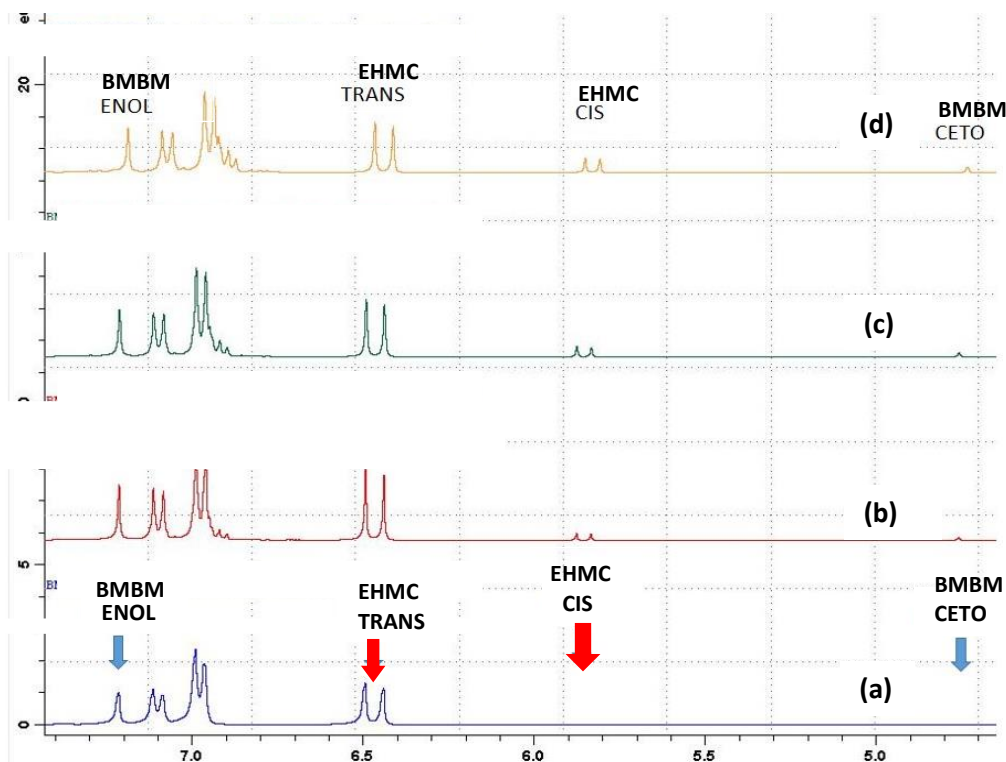
BMBM enol em 7,23 em DMSO_{d6} . Observaram também dois picos maiores e menores, dois dupletos, para **BMBM** na região aromática, o que pode indicar as orto-ressonâncias do anel fenil.

Tabela V. Quantificação das alterações moleculares apresentadas pelos filtros **BMBM** e **EHMC** combinados ou separados, com ou sem a adição de **AF** ou **RES**, em solução de $\text{DMSO}-d_6$, após exposição à radiação UV.

Soluções	Dose (horas)							
	0h		4456 J cm ⁻² (2h)		8858 J cm ⁻² (4h)		13211 J cm ⁻² (6h)	
	<i>EHMC</i> <i>trans/cis</i>	<i>BMBM</i> <i>enol/ceto</i>	<i>EHMC</i> <i>trans/cis</i>	<i>BMBM</i> <i>enol/ceto</i>	<i>EHMC</i> <i>trans/cis</i>	<i>BMBM</i> <i>enol/ceto</i>	<i>EHMC</i> <i>trans/cis</i>	<i>BMBM</i> <i>enol/ceto</i>
BMBM+EHMC	100,00	100,00	11,76	22,24	6,54	15,79	3,96	9,31
BMBM+EHMC+AF	100,00	100,00	40,67	8,90	14,75	6,45	7,71	6,19
BMBM+EHMC+RES	100,00	8,62	100,00	7,58	44,66	6,91	30,65	6,38

Legenda: **BMBM**: Butyl Methoxydibenzoylmethane; **EHMC**: Ethylhexyl Methoxycinnamate; **AF**: Ácido Ferúlico; **RES**: Resveratrol.

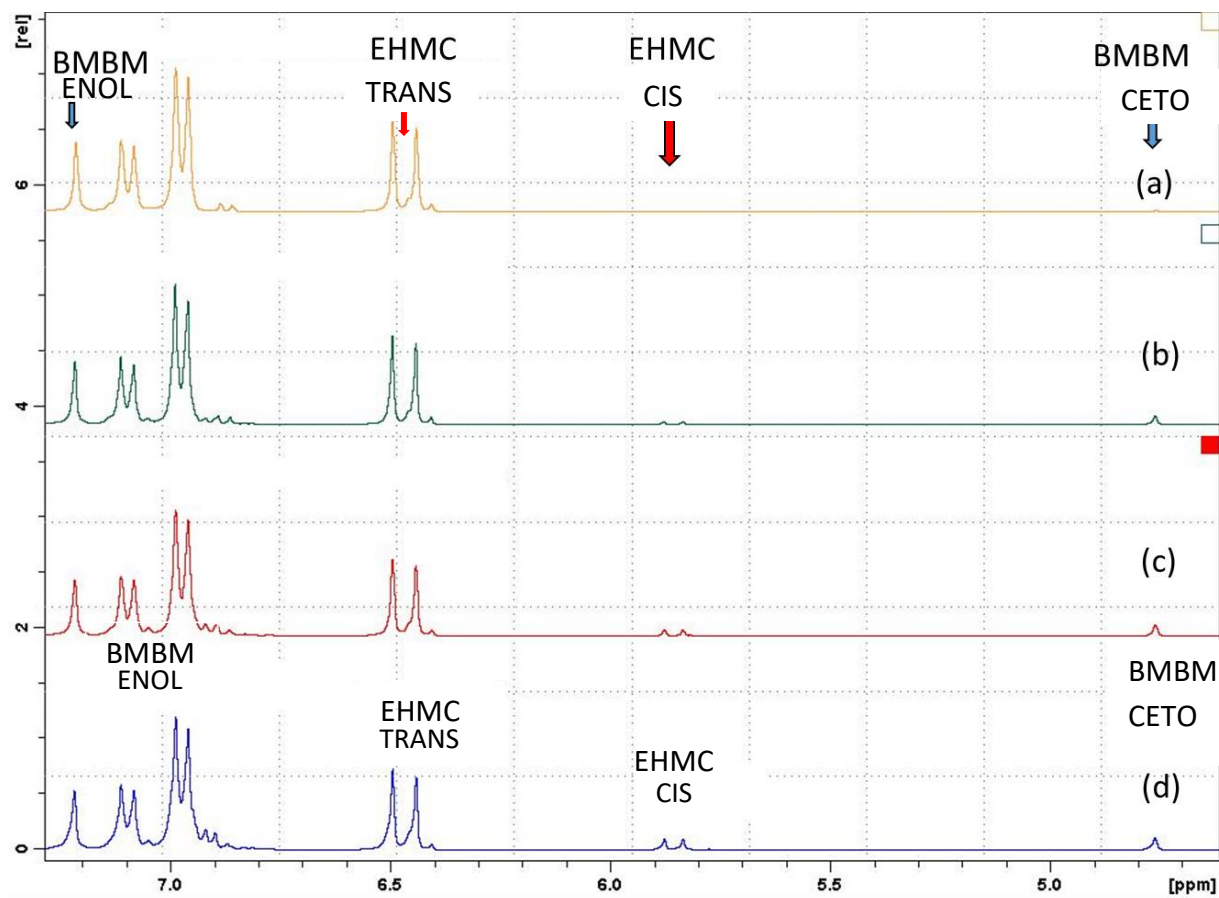
Figura 13. Espectros ¹H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC**, antes e após irradiação UV.



Legenda: **EHMC** = Ethylhexyl Methoxycinnamate; **BMBM**: Butyl Methoxydibenzoylmethane; (a) = não irradiado; (b) = após dose de 4456 J.cm⁻²; (c) = após dose de 8858 J cm⁻²; (d) = 13211 J.cm⁻². Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas *trans* e *cis* da molécula **EHMC** e *enol* e *ceto* da molécula **BMBM**.

Na **Figura 14** estão apresentados os espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC** adicionados de **AF**. Após a dose de $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, a razão *trans/cis* de **EHMC** apresentou valor de 7,71; número maior que o apresentado para solução com a mistura de filtros não adicionada de **AF** que foi de 3,96, valor este pouco expressivo.

Figura 14. Espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC**, adicionados de **AF**, antes e após irradiação UV dose de $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

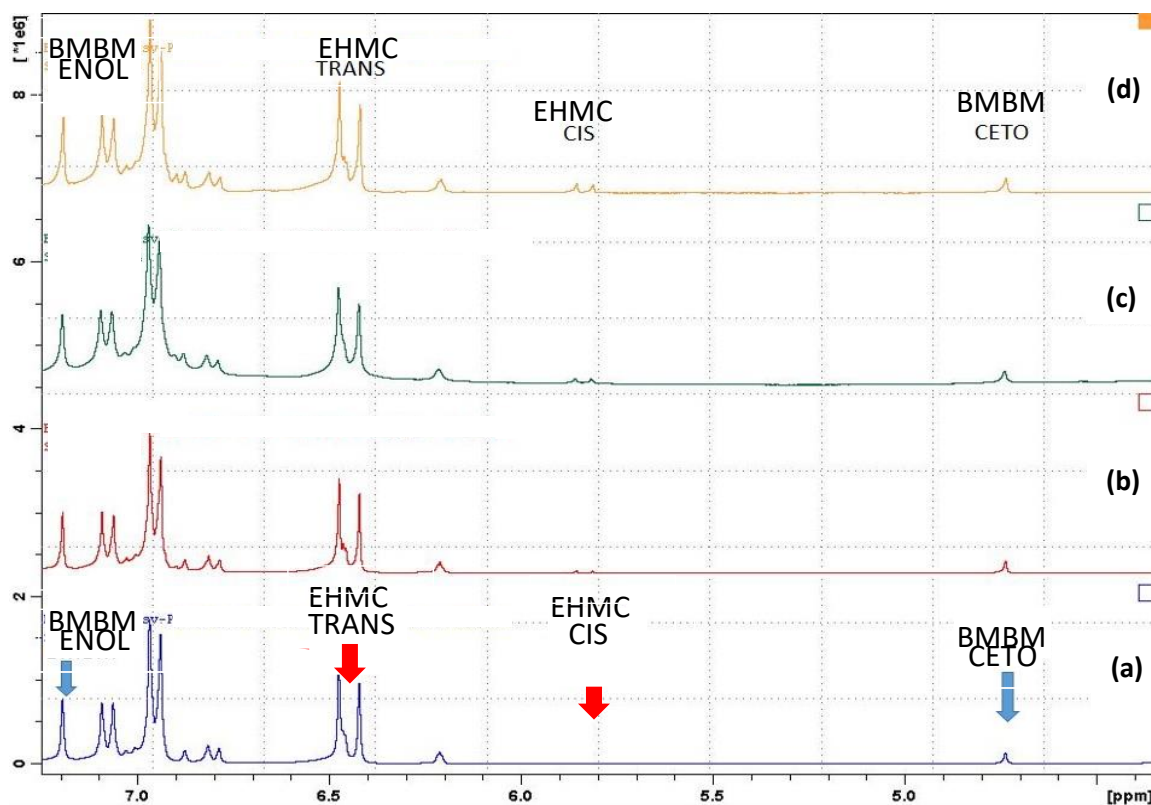


Legenda: **EHMC** = Ethylhexyl Methoxycinnamate; **BMBM**: Butyl Methoxydibenzoylmethane; **AF**: ácido ferúlico; (a) = não irradiado; (b) = após dose de $4456 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$; (c) = após dose de $8858 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$; (d) = $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Em destaque, os sinais selecionados para a quantificação das formas *trans* e *cis* da molécula **EHMC** e enol e ceto da molécula **BMBM**.

Na **Figura 15** estão apresentados os espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC** adicionados de **RES**. A simples mistura na solução antes de irradiar já apresentou parte do filtro **BMBM** na forma cetônica, em contrapartida a adição de **RES** na solução proporcionou comportamento diferenciado para o filtro **EHMC**. A adição de **RES** conservou mais a forma *trans/cis* do **EHMC** em relação a mistura de filtros sem **RES**, onde após a irradiação com a dose de $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ a razão *trans/cis* desse filtro apresentou o valor de 30,65; número maior que o obtido pela solução não adicionada de **RES** que foi de 3,96. **RES** conservou mais a

forma *trans* do **EHMC** em relação a **AF**. A forma *trans* do **EHMC** permite a absorção da radiação UVB.

Figura 15. Espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC**, adicionados de **RES** antes e pós irradiação UV com dose de $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.



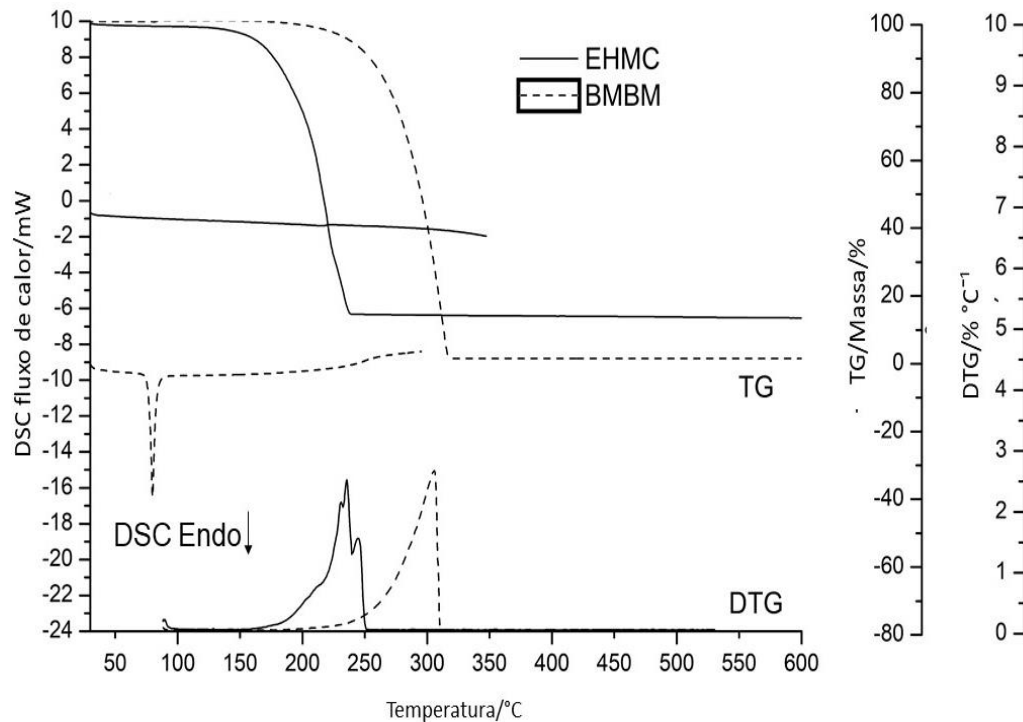
Legenda: **EHMC**= *Ethylhexyl Methoxycinnamate*; **BMBM**: =*Butyl Methoxydi-benzoylmethane*; **RES**: Resveratrol; **(a)** = não irradiado; **(b)** = após dose de $4456 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$; **(c)** = após dose de $8858 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$; **(d)** = $13211 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas *trans* e *cis* da molécula **EHMC** e enol e ceto da molécula **BMBM**.

5.2. Análise térmica

A variação da massa (TG) e da entalpia (DSC) de uma determinada amostra é quantificada em função da variação da temperatura ou do tempo. Ambas as técnicas são aplicadas na avaliação da desidratação e investigação de polimorfismo, além disso, TG e DSC podem avaliar a estabilidade térmica e o grau de pureza de uma determinada amostra, respectivamente. Assim, tais técnicas contribuem com o processo de caracterização, determinação do período de validade e cálculo dos parâmetros cinéticos, permitindo avaliar o comportamento do princípio ativo em formulações cosméticas (BROWN & GALLAGHER, 2011; PINTO, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2014).

A **Figura 16** ilustra as curvas de sobreposição TG/ DTG e curvas DSC dos filtros químicos *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (**BMBM**) e *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (**EHMC**).

Figura 16. Curvas TG, DTG e DSC obtidas $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (**BMBM**) e *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (**EHMC**).



A direção dos eventos endotérmicos nas curvas calorimétricas DSC foram indicadas por (Endo↓).

A curva DSC (**Figura 16 e Tabela VI**) da amostra **BMBM** revelou temperatura de fusão (evento endotérmico) em $79,9^{\circ}\text{C}$; com $T_{\text{onset}} 77,3^{\circ}\text{C}$ e um $\Delta H 86,5\text{ J g}^{-1}$. Segundo DANELUTI *et al*, 2018, o primeiro evento endotérmico do **BMBM** foi entre 78 e 110°C com pico de 85°C . Esta diferença de $79,9$ a 85°C deve-se às diferentes condições de experimento.

O **EHMC** à temperatura ambiente é líquido, por isso não apresentou temperatura de fusão. Houve um evento endotérmico em DSC que quando comparado com TG/ DTG foi evidenciado como volatilidade de decomposição. Segundo DANELUTI *et al.*, (2018) o evento endotérmico foi $T_{\text{onset}} 190^{\circ}\text{C}$ com $T_{\text{pico}} 233^{\circ}\text{C}$, semelhante aos valores deste trabalho ($T_{\text{onset}} = 195,6^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pico}} = 232,8^{\circ}\text{C}$) **Tabela VI**.

As curvas TG mostraram que o filtro **BMBM** é mais estável termicamente, cerca de $60,0^{\circ}\text{C}$ em relação ao **EHMC** (**Tabela VI**), porém ambos os filtros apresentaram apenas um evento de perda de massa cada: **BMBM** entre $183,8$ e $322,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, com $T_{\text{pico}} 312,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e variação

de massa de 99,1%, e **EHMC** entre 120,0 e 240,0°C, com T_{pico} 220,8°C e $\Delta m = 85,0\%$ até 600,0°C (**Figura 16, Tabela VI**).

Segundo DANELUTI *et al.*, (2018) as curvas TG do **BMBM** apresentaram dois eventos de perda de massa, o primeiro entre 218 e 405 °C com $\Delta m = 97\%$ e T_{pico} 351 °C. O segundo em 420-512 °C (T_{pico} 465 °C) com $\Delta m = 1,4\%$. Para o **EHMC** foram registrados dois eventos de perda de massa no TG, o primeiro entre 149-200 °C (T_{pico} DTG = 146), com perda de massa de 3,7% (DANELUTI *et al.*, 2018). O segundo foi de 203-338 °C (T_{pico} DTG = 293), com perda de massa de 95,5%, evento relacionado à volatilidade do material. Essas diferenças entre os resultados de DANELUTI *et al.*, (2018) com este trabalho podem ser devidas a diferentes condições experimentais ou de fornecedores de filtros solares diferentes. Os autores relataram que quando o T_{pico} muda para temperaturas mais altas, isso significa aumento térmico do filtro solar porque ele começou a se degradar em uma temperatura mais alta do que o filtro **EHMC**. Portanto, o **BMBM** é mais estável termicamente em comparação com o **EHMC** (DANELUTI *et al.*, 2018).

Nas duas amostras de filtros solares (**BMBM/ UVA** e **EHMC/ UVB**), a decomposição térmica iniciou-se acima de 120 °C (alta estabilidade térmica), um dado muito interessante no desenvolvimento de formulações contendo filtros solares. Assim, esses filtros solares permitem manter a estabilidade da formulação quando expostos em condições adversas de alta temperatura durante o prazo de validade.

Tabela VI. Dados da análise térmica das amostras do filtro. Resultados TG e DTG: massa (%) a faixa de temperatura (ΔT) e a temperatura de pico (° C). Resultados de DSC: ΔH ($J g^{-1}$), o início e as temperaturas de pico (° C).

Amostra	TG/DTG			DSC		
	ΔT °C	T_{pico} °C	Δm %	T_{pico} °C	T_{onset} °C	$\Delta H/ Jg^{-1}$
BMBM	183,8-322,0	312,5	99,1	79,9	77,3	86,5
EHMC	120,0-240,0	220,8	85,0	232,8	195,6	149,0

Legenda: **BMBM**: Butyl Methoxydibenzoylmethane; **EHMC**: Ethylhexyl Methoxycinnamate; ΔH : variação da entalpia; T_{onset} : extrapolação do início do pico; T_{pico} = temperatura do pico.

A **Tabela VII** e as **Figuras 17-20** ilustram a sobreposição das curvas TG/ DTG e DSC dos antioxidantes Resveratrol (**RES**) e ácido ferúlico (**AF**) e suas associações com as amostras de protetores solares *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (**BMBM**) e *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (**EHMC**).

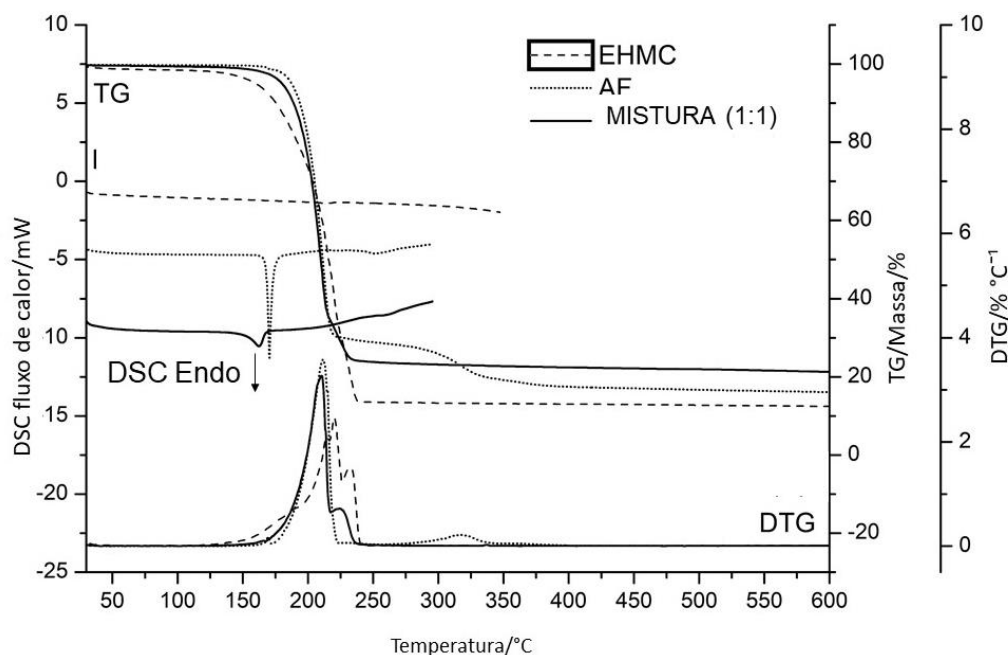
Tabela VII. Dados da análise térmica dos antioxidantes isolados e da mistura de filtro solar e antioxidantes. Resultados TG/ DTG: o Δm (%), a faixa de temperatura (ΔT) e a temperatura de pico ($^{\circ}C$). Resultados de DSC: ΔH ($J g^{-1}$), o início e as temperaturas de pico ($^{\circ}C$).

Amostra	Ev.	T _{pico} ($^{\circ}C$)	ΔT ($^{\circ}C$)	Δm (%)	Ev.	T _{pico} ($^{\circ}C$)	T _{onset} ($^{\circ}C$)	ΔH ($J g^{-1}$)
AF	1	211,3	159,9-224,1	69,4	1	170,5	168,3	156,0
	2	317,3	263,5-342,0	8,8				
RES	1	324,5	268,1-409,9	46,3	1	267,2	265,4	232,0
EHMC+ AF (1:1)	1	210,4	157,9-217,4	64,2	1	162,4	153,4	55,8
	2	225,4	217,4-239,2	10,2				
EHMC+ RES (1:1)	1	226,4	116,4-234,3	62,1	1	215,7	187,0	79,1
	2	288,0	234,3-360,0	17,9	2	265,1	252,4	153,1
BMBM+ RES (1:1)	1	324,2	169,9-234,3	65,5	1	80,4	77,4	88,6
	2	288,5	234,3-373,4	14,1	2	264,3	257,8	74,0
BMBM+ AF (1:1)	1	232,3	163,9-244,9	43,2	1	80,5	77,8	50,1
	2	311,6	244,9-324,4	52,1	2	152,9	133,9	39,1

Legenda: **AF:** Ferulic acid; **RES:** Resveratrol; **BMBM:** Butyl Methoxydibenzoylmethane; **EHMC:** Ethylhexyl Methoxycinnamate; **Ev.**= evento; **ΔH :** variação de entalpia; **T_{pico}** = temperature de pico; **ΔT** = faixa de temperature de decomposição; **Δm** = perda de massa.

Para a amostra de **EHMC** adicionada dos antioxidantes **AF** e **RES**, separadamente, as curvas TG apresentaram dois eventos de perda de massa. Na mistura **AF** com **EHMC** (**Figura 17**) a primeira ocorreu na faixa de 157,9-217,4 $^{\circ}C$, correspondendo a uma diminuição de 64,2% e a outra perda ocorreu em 217,4-239,2 $^{\circ}C$, com perda de massa de 10,2%. A amostra de **AF** antecipou em 1 $^{\circ}C$ a decomposição de T_{pico} (primeiros eventos de TG na **Tabela 2**) na mistura (de 211,3 para 210,4 $^{\circ}C$) e ponto de fusão (T_{pico} 170,5 a 162,4 $^{\circ}C$). Segundo Damasceno (2011), o **AF** derrete a 177 $^{\circ}C$, em diferentes condições experimentais.

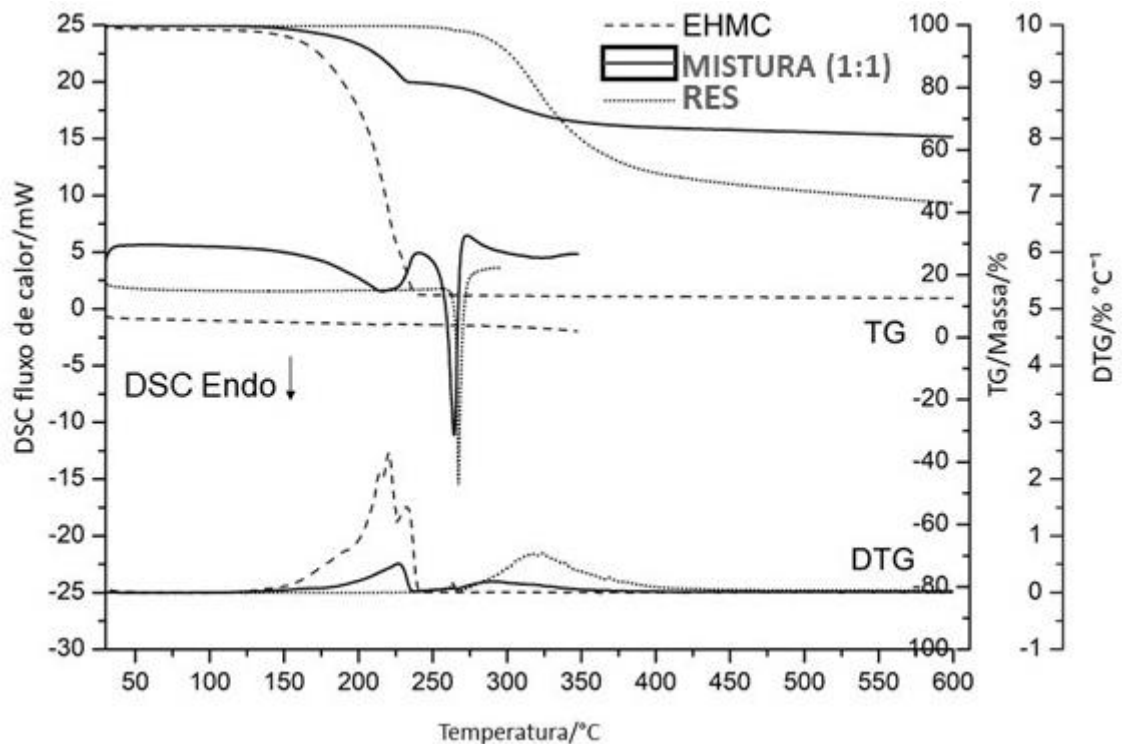
Figura 17. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra: **EHMC**, **AF** e **EHMC+AF**.



Houve interação química na mistura de **EHMC** com **AF**, evidenciada pela variação da entalpia ($55,8\text{ J g}^{-1}$) em aproximadamente 1/3 da **AF** quando comparada ao isolado ($156,0\text{ J g}^{-1}$). De acordo com CERESOLE *et al.*, (2013) os ingredientes que interagiram quimicamente com o **BMBM** tiveram o T_{pico} DSC alterado para uma temperatura mais baixa com uma redução significativa na entalpia. De acordo com CERESOLE *et al.*, (2013) houve interação química de outras substâncias com **BMBM** quando o valor da entalpia poderia ser a média das duas substâncias. No presente estudo, sugerimos duas hipóteses para explicar esse fenômeno do ponto de fusão com diminuição de sua entalpia (dados DSC): (1) formação de um novo composto que requeria menos energia para que o evento endotérmico ocorresse e ou (2) os isômeros *cis* de **EHMC** ou **AF** reduziu a entalpia. No segundo caso, a eficácia e a segurança da atividade antioxidante ou fotoprotetora poderiam ser comprometidas.

Na associação do **EHMC** com **RES** (Figura 18), a faixa de temperatura de decomposição do **EHMC** não apresentou alterações significativas, provavelmente por sua volatilização. Essa associação mostrou dois eventos térmicos com perda de massa, ocorridos na faixa de temperatura entre $116,4\text{--}234,3^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 62,1\%$) e $234,3\text{--}360,0^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m = 17,9\%$), respectivamente, totalizando 80% de perda de massa.

Figura 18. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra: **EHMC**, **RES** e **EHMC + RES**.

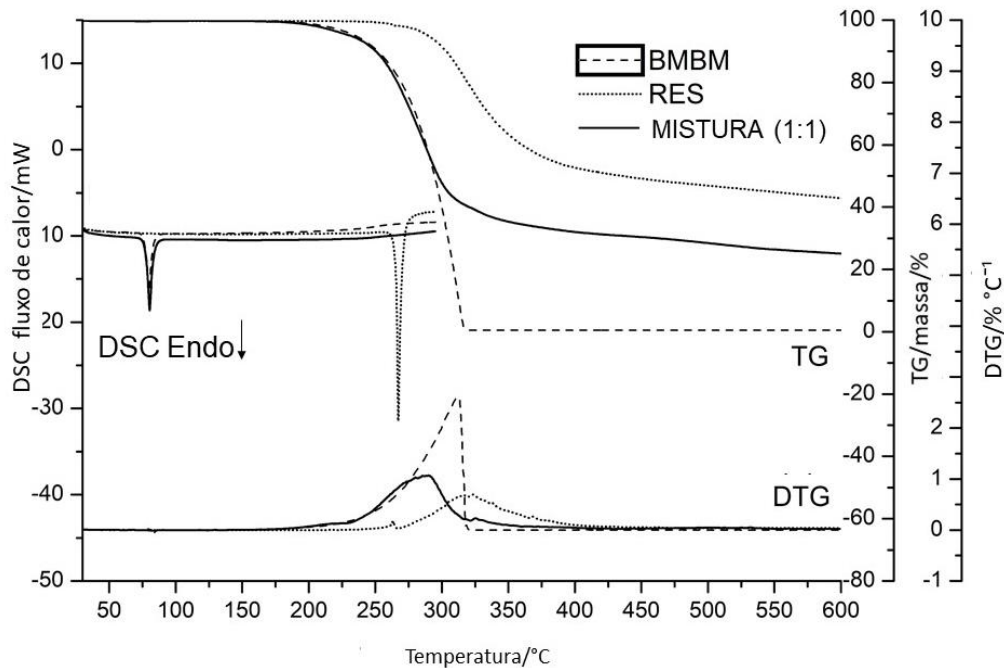


A curva DSC apresentou dois eventos endotérmicos com T_{pico} em 215,7 e 265,1 $^{\circ}\text{C}$, com entalpia de 79,1 e 153,1 Jg^{-1} , respectivamente. Comparando os dados de DSC da amostra **RES** isolada (T_{pico} DSC 267,2 $^{\circ}\text{C}$) e em mistura (T_{pico} DSC 265,1 $^{\circ}\text{C}$), observou-se um pequeno deslocamento do ponto de fusão em 2,1 $^{\circ}\text{C}$. Assim, é possível verificar que houve interação física sem comprometer o **RES**, confirmado pelas curvas TG, o que evidenciou que o **RES** pode estar mais disponível na formulação para a ação cosmética. Segundo Oliveira, Yoshida, Gomes (2011) a diminuição do ponto de fusão e do valor da entalpia é indicativo de interação.

As curvas TG da associação de **BMBM** com **RES** (Figura 19) mostraram que um evento de perda de massa ocorreu na faixa de temperatura entre 169,9-234,3 $^{\circ}\text{C}$, com diminuição da massa de 65,5%. A curva DSC evidenciou um evento endotérmico com $T_{\text{pico}} = 80,4$ $^{\circ}\text{C}$ e o desaparecimento do pico de fusão do **RES** na mistura com **RES + BMBM**. Na análise DSC da mistura binária ou multicomponente, o fármaco pode ser solubilizado durante o aquecimento por um excipiente da mistura. Isso ocorre quando o excipiente tem uma faixa de temperatura de fusão mais baixa e pode solubilizar o fármaco presente na mistura (OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011). O valor de entalpia da mistura (88,6 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$) foi de aproximadamente 1/3 do **RES** quando comparado com a substância isolada (232,0 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$). Neste caso, houve interação química confirmada pelo perfil TG e apenas um pico de

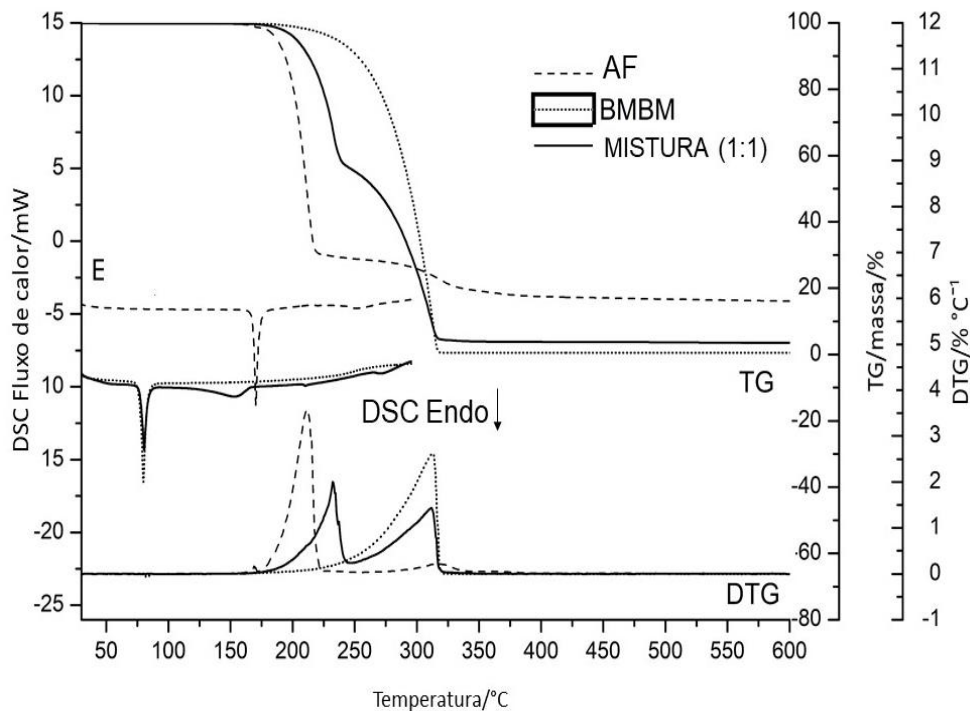
degradação para a mistura, provavelmente pela reação entre as ligações hidrofóbicas **BMBM** e os grupos hidroxila do Resveratrol (BALANC *et al.*, 2016).

Figura 19. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra: **BMBM**, **RES** e **BMBM + RES**.



As curvas TG mostraram que a amostra de **RES** isolado começou a degradar a $268,1^{\circ}\text{C}$, e na mistura a $234,3^{\circ}\text{C}$, o que evidencia que o **RES** é mais estável termicamente isolado do que associado ao filtro **BMBM**. LIU *et al.*, 2005, analisaram o fármaco azadirachtina associado às ciclodextrinas e concluíram que a decomposição tardia pode indicar que os compostos são termicamente estáveis. As curvas TG da mistura **BMBM + AF** (**Figura 20**) evidenciaram dois eventos térmicos ocorridos de $163,9$ a $244,9^{\circ}\text{C}$, com decréscimo de $43,2\%$ da massa e de $244,9$ a $324,4^{\circ}\text{C}$, com perda de massa de $52,1\%$. Na curva DSC (**Figura 20**) da respectiva mistura evidenciaram-se dois eventos endotérmicos com T_{pico} a $80,5$ e $152,9^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A antecipação da temperatura de pico de fusão do **AF** isolado em relação ao **AF** na mistura com o **BMBM** ($170,5$ a $152,9^{\circ}\text{C}$, respectivamente), pode ser explicada pela solubilização do **AF** (sólido) no **BMBM** (líquido após fusão).

Figura 20. Curvas TG/ DTG e DSC obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra: **BMBM**, **AF** e **BMBM + AF**.



Essa interação física foi confirmada pelo perfil das curvas TG e DTG desta associação que mostraram a ocorrência de dois picos relacionados à degradação de cada ingrediente presente na mistura. Esses resultados evidenciam a importância da associação das técnicas DSC e TG, conforme relatado por (OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011).

Segundo Oliveira, Yoshida, Gomes (2011) é possível avaliar uma interação (ou não) entre fármaco e excipiente por meio de medidas de DSC associadas ao TG dinâmico. Se a perda de massa obtida pela curva TG da mistura binária (associação do fármaco ao excipiente) não for a soma da perda de massa individual desses compostos (fármaco e excipiente isolados) obtida por suas respectivas curvas TG, há incompatibilidade na mistura proposta. Esses resultados reforçam a conclusão sobre a interação física entre **BMBM + AF** na presente pesquisa.

As curvas TG e DTG a mistura de **BMBM + AF** mostraram um deslocamento para maior temperatura a degradação de **AF** ($211,3$ a $232,3^{\circ}\text{C}$) e diminuindo o Δm de $69,4$ a $43,2\%$, evidenciando assim, houve um aumento na estabilidade térmica do **AF** quando incorporado a esta mistura. Esse comportamento é interessante pela maior estabilidade desse ingrediente na formulação. A presença de picos finos e agudos indicou que esses ingredientes **AF** e **BMBM** são puros o que está de acordo com o conteúdo do certificado de análise dos fornecedores $98,6$ e $99,8\%$, respectivamente (COLEMAN & CRAIG, 1996).

As curvas TG das amostras isoladas de antioxidantes (**Tabela VII**) revelaram que o **RES** (com $\Delta T = 268,1-409,9$ °C) é mais estável termicamente pelo menos 78 °C do que o **AF** (com $\Delta T = 159,9-342,0$ °C). Silva e colaboradores (2017b) relatou que o início da decomposição térmica do **RES** iniciou a decomposição por volta de 268,1 °C, similarmente alcançado no presente trabalho. Bezerra (2017) obteve valores diferentes de temperatura de degradação (147-407 °C) avaliando amostras de **AF**, porém em condições experimentais diferentes (atmosfera sintética - oxidativa e taxa de aquecimento 20 °C) das aqui utilizadas. Segundo Mendes (2011), **RES** teve dois eventos de perda de massa observados pela curva DTG, sendo o primeiro observado na região entre 351,85 e 484,85 °C. Foi relatado na literatura que o Resveratrol era termicamente estável até 240 °C. Pico endotérmico acentuado a aproximadamente 267 °C e 50% da perda de massa associada à sua fusão (MENDES, 2011), semelhantes aos valores obtidos neste trabalho.

Os dados de DSC corroboram os resultados de TG, que mostram que a amostra do antioxidante **RES** exibiu temperatura de fusão em torno de 267,2 °C (Tpico DSC) (ZHOU *et al.*, 2016). O **AF** derrete cerca de 170,5 °C e os dados estão de acordo com a literatura científica (DAMASCENO, 2011). Neste caso, **AF** e **RES** começaram a degradar em altas temperaturas. Essas informações podem ser vantajosas antes do desenvolvimento de formulações de fotoprotetores, pois muitas vezes ficam expostas ao sol, embora outras características devam ser consideradas.

Diante do exposto, as técnicas DSC e TG foram utilizadas simultaneamente para verificar a ocorrência (ou não) de interação entre as amostras dos filtros e antioxidantes e qual a natureza dessa interação (física ou química). Misturas que tiveram interações físicas podem ser indicadas em estudos de pré-formulações devido à manutenção da eficácia e segurança de seus ingredientes (antioxidantes e filtros solares).

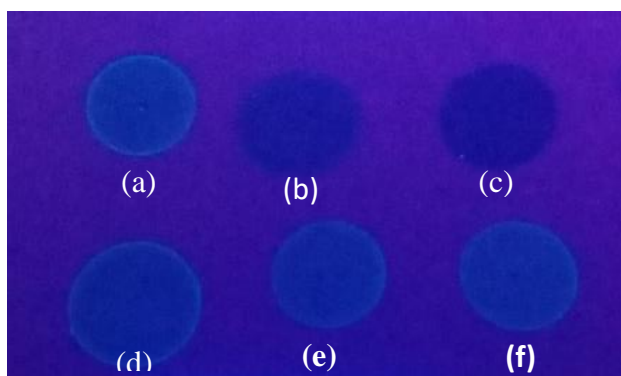
5.3. Análise Qualitativa da Supressão do estado de energia singlete por fluorescência

Os filtros solares ao absorverem a radiação ultravioleta ficam com suas moléculas em estado excitado (ressonância) e seus elétrons podem ir para orbitais de maior energia mantendo a orientação original (estado singlete) ou para um orbital de menor energia invertendo a orientação original (estado tripleto). Para os filtros continuarem absorvendo radiação ultravioleta é necessário que após excitados retornem ao estado fundamental rapidamente, o que pode ser obtido pela inibição do estado singlete e tripleto. Por meio da emissão da fluorescência é possível analisar de forma qualitativa se houve ou não inibição do

estado singleto. Algumas moléculas possuem a capacidade de suprimir o estado singleto e estabilizar o filtro solar diminuindo, também, sua fluorescência (BONDA, 2009; PINTO, 2014). Foi verificada a capacidade dos antioxidantes **AF** e **RES** como supressores do estado singleto dos filtros **EHMC** e **BMBM**.

As imagens captadas do ensaio são comparativas, sendo que nas **Figuras 21, 22, 23 e 24** são relativas a avaliação da capacidade de supressão do estado singleto das moléculas dos filtros **BMBM** e **EHMC**, isolados ou combinados, pelos antioxidantes **AF** e **RES**.

Figura 21. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro **BMBM** por **RES**.

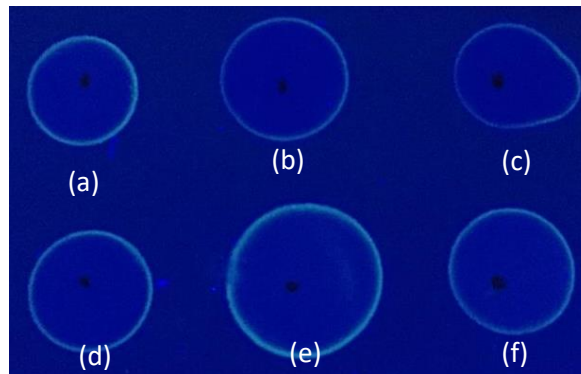


Legenda: Solução teste **BMBM**: (a) 2,0:0,0; Solução **BMBM+RES**: (b) 2,0:1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo **BMBM** e **benzoato de feniletila**: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0:1,0 e (f) 2,0:2,0.

Foi possível visualizar que ocorreu a supressão da fluorescência do **BMBM** com a adição de **RES** (**Figura 21**) e que essa supressão foi dependente da concentração, uma vez que o escurecimento foi mais evidente na combinação da **BMBM** e **RES** 2,0:2,0 em relação à amostra 2,0:1,0. Comparando-se as imagens (b e c) das soluções testes com as do controle negativo (e e f) foi possível verificar que as últimas apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparadas as soluções com **RES** (b e c). Este resultado foi atribuído à capacidade do **RES** de suprimir o estado excitado singleto do **BMBM**, ou seja, mantendo a fotoestabilidade do filtro **BMBM** (BONDA, 2008; PINTO, 2014).

Não foi possível visualizar a supressão do oxigênio singleto da mistura **BMBM** com a adição de **AF** (**Figura 22**).

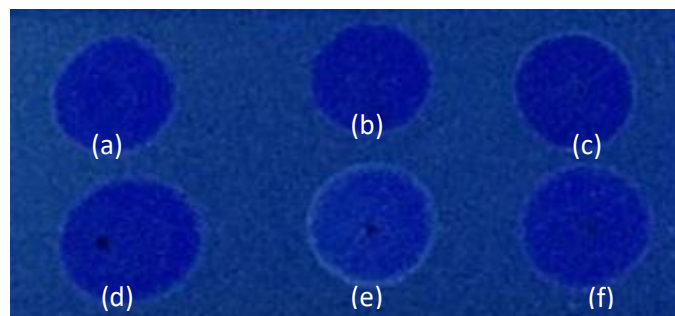
Figura 22. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro **BMBM** por **AF**.



Legenda: Solução teste **BMBM**: (a) 2,0:0,0; Solução **BMBM+AF**: (b) 2,0;1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo **BMBM** e **benzoato de feniletila**: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0;1,0 e (f) 2,0:2,0.

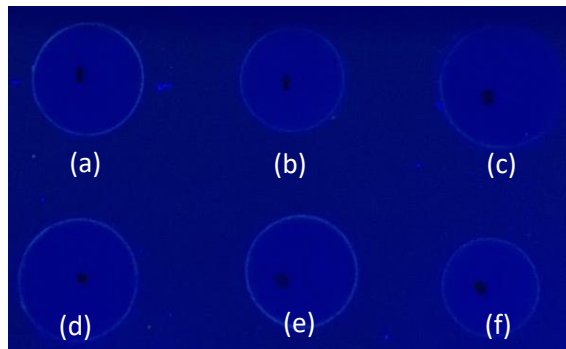
Foi observado efeito de inibição sutil da fluorescência quando os dois filtros em solução são adicionados de **RES** (b e c, **Figura 23**). O **EHMC** não emitiu fluorescência, dificultando a visualização do resultado. O **AF** quando em solução com **EHMC** e **BMBM** (**Figura 24**), não inibiu a fluorescência, não contribuindo para a fotoestabilidade de **BMBM** por este mecanismo.

Figura 23. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto dos filtros **BMBM** + **EHMC** por **RES**.



Legenda: Solução teste **BMBM+EHMC**: (a) 2,0:0,0; Solução **BMBM+EHMC+RES**: (b) 2,0;1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo **BMBM+EHMC** e **benzoato de feniletila**: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0;1,0 e (f) 2,0:2,0.

Figura 24. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singlete dos filtros **BMBM** + **EHMC** por **AF**.



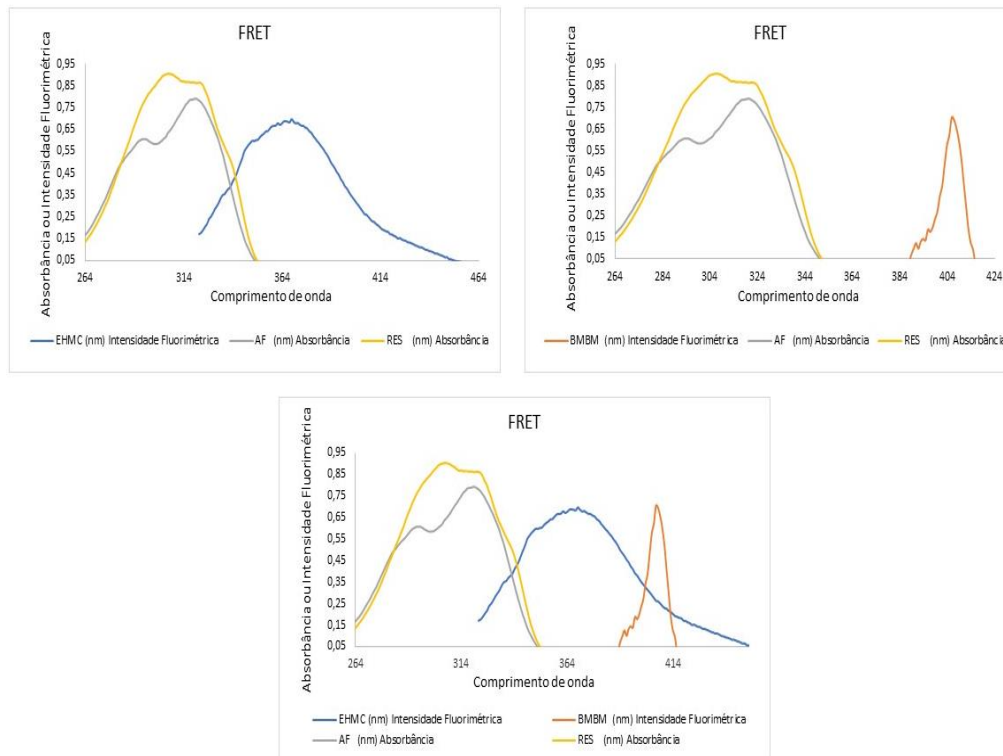
Legenda: Solução teste **BMBM+EHMC**: (a) 2,0:0,0; Solução **BMBM+EHMC+AF**: (b) 2,0;1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo **BMBM+EHMC** e **benzoato de feniletila**: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0;1,0 e (f) 2,0:2,0.

5.4. Seleção de antioxidantes como potencial fotoestabilizador por transferência de energia de ressonância Förster (FRET)

As teorias para transferência de energia desenvolvidas por Förster (FRET) relacionam as taxas de transferência de energia do doador no estado excitado singlete para o receptor por meio de uma sobreposição espectral integral. A magnitude espectral e a integral de sobreposição, por sua vez, estão relacionadas à probabilidade de o doador e o receptor serem energeticamente compatíveis (BONDA, 2008), conforme apresentado na **Figura 25**.

De acordo com a **Figura 25**, as curvas dos antioxidantes Resveratrol e *Ácido ferúlico* interceptaram a curva do *Ethylhexyl methoxycinnamate* (**EHMC**), o que significa que estes conseguem absorver a energia emitida pelo **EHMC**, evitando a passagem pelo estado tripleto, favorecendo a fotoestabilidade deste filtro solar. Em relação ao *Butyl methoxydibenzoylmethane* (**BMBM**) não houve interceptação, indicando que estes antioxidantes não estão aptos à absorver a energia emitida por este mecanismo.

Figura 25: Sobreposição das curvas de absorvância e fluorescência das soluções de acetato de etila e **BMBM**, **EHMC**, **AF** e **RES**.



Legenda: **BMBM** = *Butyl methoxydibenzoylmethane*; **EHMC**: *Ethylhexyl methoxycinnamate*; **RES**: Resveratrol; **AF**: Ácido Ferúlico; **FRET**: transferência de energia por Förster

5.5. Avaliação da Estabilidade Preliminar

5.5.1. Teste de centrifugação

As emulsões **A1** e **B1** foram classificadas como normal (**N**), quando não ocorreu alteração quanto ao aspecto.

5.5.2. Estresse térmico

Neste ensaio, as emulsões não apresentaram separação de fases. Foi escolhida a base **A1** devido melhores características sensoriais (**Figura 26**).

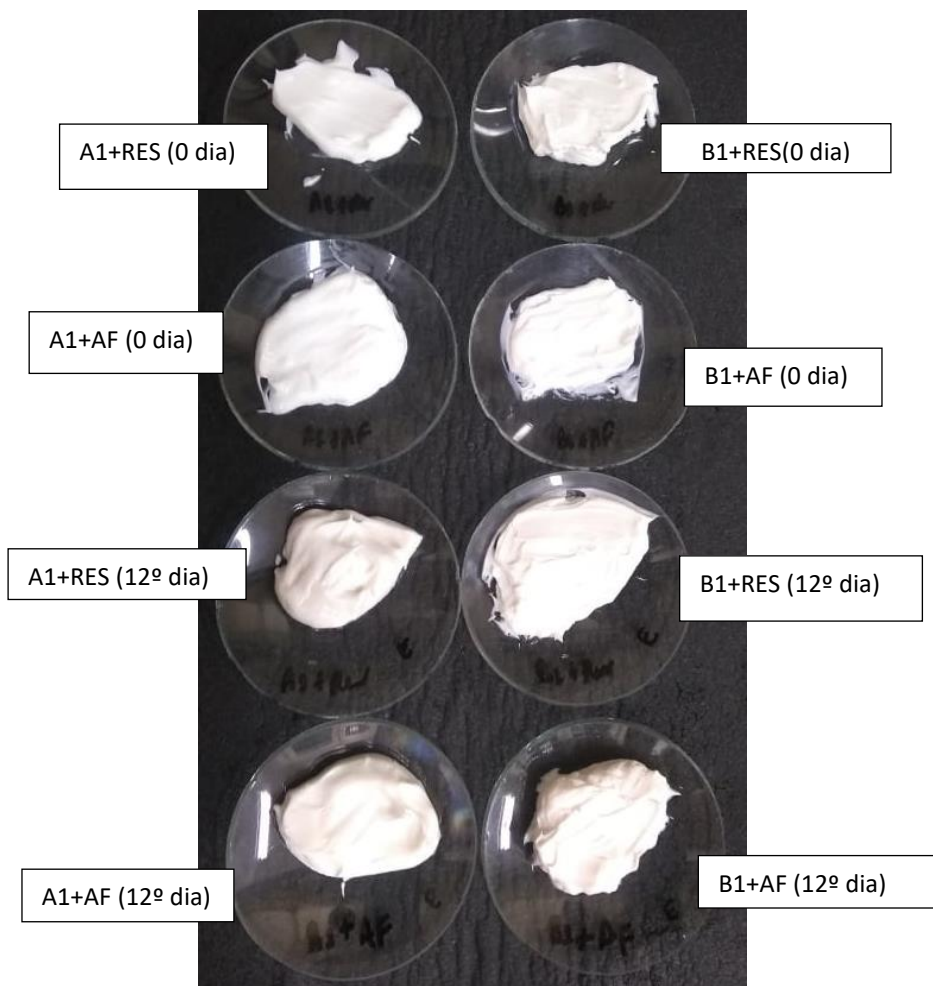
Figura 26. Formulações **A1** e **B1** adicionadas ou não de **AF** e **RES**, após estresse térmico.



5.6. Avaliação da Estabilidade Acelerada

As características organolépticas (apecto, cor e odor) foram consideradas normais quando comparadas com o tempo inicial (t_0), na condição do ciclo gela-degela (**Figura 27**).

Figura 27. Formulações **A1** e **B1** com e sem **AF** e **RES** após ciclos gela-degela.



*Legenda: **A1**: 0,5% ammoniumacryloyl-dimethyltaurate/vp copolymer; **B1**: 1% ammonium acryloyl-dimethyltaurate/vpcopolymer; **AF**: Ferulic Acid; **RES**: Resveratrol.*

O comportamento nesta condição drástica de expor a $45,0 \pm 2,0$ °C e $5,0 \pm 2,0$ °C, 24h, por 12 dias (seis ciclos no total) foi de não separação de fases ou outra alteração, o que indicou elevada estabilidade das preparações.

5.7. Avaliação da Estabilidade Normal (AEN)

As características organolépticas de todas as preparações mantiveram-se aceitáveis e próximas ao t_0 , 24h do preparo, indicando estabilidade adequada das preparações, inclusive em valores de temperatura elevada, $45,0 \pm 2,0$ °C (E), condição que geralmente induz à instabilidade das formulações (**Tabela VIII**). Nesta Tabela verificou-se que a adição dos

antioxidantes (Resveratrol e Ácido Ferúlico) na base fotoprotetora **A1** = base com filtro (**BF**) reduziu o valor de pH durante a AEN, observada nas condições apresentadas por 90 dias (**Tabela VIII**).

Referente aos resultados apresentados, o valor de pH no t0 das formulações testadas não foi o mesmo, respeitando a faixa de estabilidade dos antioxidantes e favorecendo a forma molecular dos mesmos, sendo os valores iniciais de pH de **BF+AF** (3,7) e **BF+RES** (4,4) dentro do intervalo ácido, em comparação a formulação base **BF** (5,26). O pKa do **AF** é 4,56 (PUBCHEM, 2019a) e valores de pH inferiores permitem que o **AF** esteja mais na forma molecular do que iônica, permitindo sua ação e maior eficácia, uma vez que a molécula não ionizada penetra melhor na pele em relação a ionizada (DRAELOS, 2010). De acordo com Zupančič, Lavrič, Kristl (2015) em pH ácido, o *trans*-resveratrol foi estável e sua degradação aumentou exponencialmente acima de pH 6,8. O valor de pKa do **RES** é 8,99 (PUBCHEM, 2019b) e valores inferiores, ou ácidos, permitem que o **RES** permaneça na forma molecular e, conseqüentemente, mais ativo (RANG *et al.*, 2007). De acordo com Delmas *et al.* (2011) o conhecimento do estado de protonação do *trans*-resveratrol é importante no entendimento de suas atividades biológicas, pois quando o pH do meio é superior ao pKa, a atividade biológica do *trans*-resveratrol é fortemente reduzida. Devemos considerar que o pH fisiológico é 4,0-6,0 (FREIRE *et al.*, 2019, DRAELOS, 2010).

No decorrer da AEN houve variação no percentual do valor de pH, porém, essa variação foi considerada adequada até 10% (BABY, 2004). **BF** apresentou alteração do valor de pH durante a AEN com tendência a estabilizar a partir dos 30 dias, sendo a condição de $45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (E) com maior percentual de variação no t60 e t90, condição esta considerada não adequada. Para a condição de (E) é esperado alterações do parâmetro de estabilidade, devido a aceleração das reações com o aumento da temperatura. A condição de armazenamento sugerida para **BF** é $20,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A). O percentual de variação de **BF+RES** foi aceitável durante os 90 dias em todas as condições de armazenamento, com alterações pontuais no t15 (A) e t30 na (E) e a condição de $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (G) indicou ser mais adequada para **BF+RES** em relação a este parâmetro. O percentual de variação do valor de pH para **BF+AF** foi aceitável até o t30 na condição de temperatura (A) e (G) e na estufa até o t15. Ao final do teste houve grande variação do valor do pH para todas as temperaturas de armazenamento, considerando o limite de 10%. As condições de armazenamento sugeridas para **BF+AF** são (A) e (G).

Tabela VIII. Características organolépticas (aparência, cor e odor), valor de pH e porcentagem de variação do valor de pH da formulação escolhida: **A1** = base com filtro (**BF**) aditivada ou não com Resveratrol ou Ácido Ferúlico, durante a *Avaliação da Estabilidade Normal*, 90 dias.

Teste	20,0 ± 2,0°C (A)						5,0 ± 2,0°C (G)						45,0 ± 2,0°C (E)					
	tempo (dias)																	
BF	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	5,3	5,9	5,3	5,7	5,9	5,6	5,3	5,7	5,6	6,0	6,0	5,6	5,3	5,2	5,7	5,7	6,1	6,0
(%) pH	-	11,3	0,0	7,5	11,3	5,6	-	7,5	5,6	12,6	13,6	5,6	-	1,8	7,5	7,5	15,1	13,6
BF+RES	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	4,5	4,5	3,9	4,1	4,1	4,2	4,5	4,5	4,3	4,5	4,4	4,5	4,5	4,3	4,3	4,0	4,3	4,4
(%) pH	-	0,0	13,3	8,9	8,9	6,7	-	0,0	4,4	0,0	2,2	0,0	-	4,4	4,2	11,1	4,4	4,4
BF+AF	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90	0	7	15	30	60	90
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
pH	3,6	3,6	3,6	3,3	2,4	2,2	3,6	3,8	3,6	3,3	2,5	2,1	3,6	3,6	3,5	3,0	2,5	1,8
(%) pH	-	0,0	0,0	8,3	33,3	38,9	-	5,6	0,0	8,3	30,6	41,7	-	0,0	2,7	16,7	30,6	50,0

Legenda: **N:** normal; **M:** modificado; **t0:** tempo inicial (48 horas após a preparação), considerada como referência para comparação; (-): não aplicável.

5.8. Eficácia Fotoprotetora *in vitro* e Fotoestabilidade das formulações no decorrer da Avaliação da Estabilidade Normal (AEN)

De acordo com os resultados da avaliação do FPS *in vitro* das formulações não submetidas à radiação, o percentual de variação de FPS em relação a formulação **BF** no t0 foi de 1,49% para **BF+RES** e de 8,16% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações não irradiadas e irradiadas, valor de $p \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Além disso, não houve diferença significativa entre as formulações não irradiadas e entre as formulações irradiadas, porque não compartilharam a mesma letra, o que indica que a adição dos antioxidantes não elevou o valor de FPS de forma expressiva e também não mateve o valor de FPS no t0.

No decorrer dos 90 dias da AEN, em todas as condições ambientais do estudo sem irradiação, a adição do antioxidante Resveratrol (**BF+RES**) praticamente manteve o valor de FPS quando comparado às formulações **BF** e **BF+AF**. Na condição de estufa ($45,0 \pm 2,0$ °C), a formulação **BF+RES**, apresentou os maiores valores de FPS em relação as demais formulações fotoprotetoras, mesmo sendo esta condição ambiental considerada desfavorável para a estabilidade (FREIRE, 2019; BRASIL, 2004).

O percentual de variação de FPS no **t30A** sem irradiação em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 15,31% para **BF**, 15,29% para **BF+RES** e de 10,75% para **BF+AF**. Houve também diferença significativa entre **BF+RES** e as outras formulações por não compartilhar a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela IX, Figura 33**). De acordo com Morocho-Jácome *et al.* (2020), formulações com Resveratrol apresentaram sinergismo e atividade fotoprotetora em formulações com filtros solares sintéticos. O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t30G** em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 44,28% para **BF**; 0,60% para **BF+RES** e de 17,55% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações por não compartilharem a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela IX, Figura 28**).

Tabela IX. Caracterização funcional (FPS *in vitro*, λ_c , razão UVA/ UVB, porcentagem de manutenção do valor de FPS após irradiação) durante a Avaliação da Estabilidade Normal em t0 (48h da preparação) e por 90 dias (t30, t60 e t90) para as formulações fotoprotetoras adicionadas ou não de Resveratrol e Ácido Ferúlico.

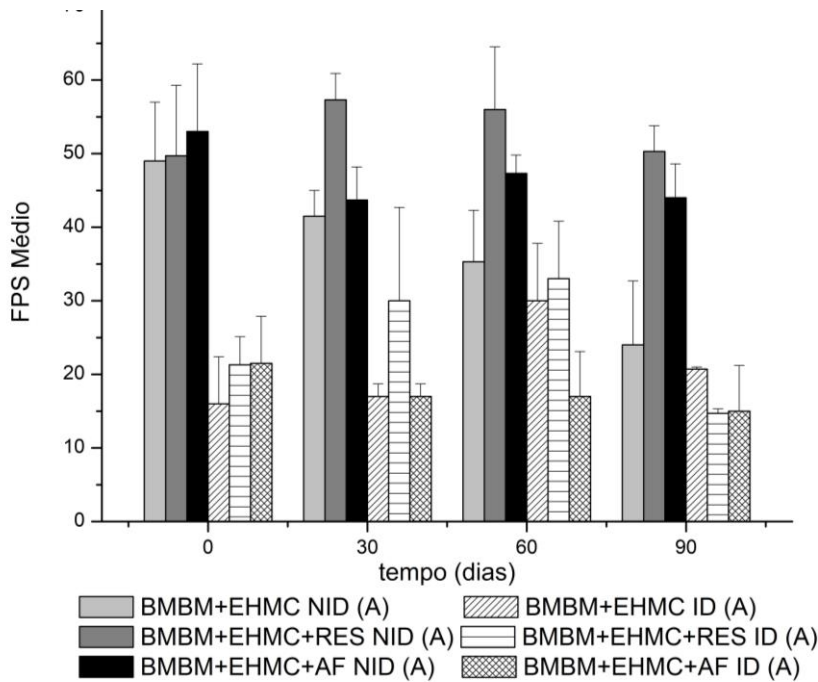
		Parâmetros avaliados					
		FPS <i>in vitro</i> ±DP		λ_c ±DP		Razão UVA/ UVB±DP	
		Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado
BF	t0	49,0±8,0 ^A	16,0±6,4 ^B	382,0±0,6 ^A	379,3±0,6 ^B	0,856±0,0 ^A	0,743±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,005		0,000		0,000	
BF+RES		49,7±9,6 ^A	21,3±3,8 ^B	382,0±1,0 ^A	379,7±0,6 ^B	0,845±0,0 ^A	0,742±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,009		0,003		0,000	
BF+AF		53,0±9,2 ^A	21,5±6,4 ^B	382,3±0,6 ^A	379,7±0,6 ^B	0,860±0,0 ^A	0,736±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,012		0,008		0,001	
BF	t30A	41,5±3,5 ^{AB}	17,0±1,7 ^C	382,0±0,0 ^B	379,3±0,6 ^C	0,847±0,0 ^A	0,706±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,001		0,021		0,000	
BF+RES		57,3±3,6 ^A	30,0±12,7 ^B	383,7±0,0 ^A	378,3±0,6 ^C	0,848±0,0 ^A	0,709±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,010		0,000		0,006	
BF+AF		43,7±4,5 ^{AB}	17,0±1,7 ^C	382,0±0,0 ^B	379,3±0,6 ^C	0,847±0,0 ^A	0,698±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,011		0,021		0,006	
BF	t30G	27,3±2,1 ^C	25,3±2,5 ^C	382,0±0,0 ^A	379,0±0,0 ^B	0,837±0,0 ^A	0,730±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,367		0,000		0,000	
BF+RES		50,0±9,2 ^A	30,7±5,8 ^{BC}	382,7±0,0 ^A	378,7±0,6 ^B	0,849±0,0 ^A	0,686±0,0 ^{BC}
<i>P</i> - valor		0,025		0,002		0,000	
BF+AF		43,7±4,6 ^{AB}	26,0±6,6 ^C	382,0±0,0 ^A	378,3±0,6 ^B	0,846±0,0 ^A	0,703±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,024		0,003		0,195	
BF	t30E	26,0±3,6 ^B	21,3±6,0 ^B	382,3±0,0 ^A	378,3±0,6 ^B	0,854±0,0 ^A	0,730±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,036		0,056		0,001	
BF+RES		48,8±4,4 ^A	19,3±2,5 ^B	383,0±0,0 ^A	378,0±0,0 ^B	0,854±0,0 ^A	0,684±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,002		0,000		0,000	
BF+AF		31,3±2,1 ^B	30,3±3,8 ^B	382,0±0,6 ^A	378,7±0,6 ^B	0,845±0,0 ^A	0,710±0,0 ^{BC}
<i>P</i> - valor		0,000		0,001		0,212	
BF	t60A	35,3±7,0 ^{BC}	30,0±7,8 ^{CD}	381,3±0,6 ^{AB}	379,0±0,0 ^C	0,843±0,0 ^A	0,706±0,0 ^D
<i>P</i> - valor		0,224		0,005		0,000	
BF+RES		56,0±8,5 ^A	33,0±7,8 ^{BCD}	380,3±0,6 ^B	379,0±0,0 ^C	0,786±0,0 ^C	0,708±0,0 ^D
<i>P</i> - valor		0,013		0,005		0,001	
BF+AF		47,3±2,5 ^{AB}	17,0±6,1 ^D	381,7±0,6 ^A	379,0±0,0 ^C	0,817±0,0 ^B	0,712±0,0 ^D
<i>P</i> - valor		0,015		0,003		0,287	
BF	t60G	27,5±0,7 ^{BC}	25,7±3,8 ^C	381,3±0,6 ^B	379,0±0,0 ^D	0,820±0,0 ^B	0,712±0,0 ^C

Continuação Tabela IX. Caracterização funcional (FPS *in vitro*, λ_c , razão UVA/ UVB, porcentagem de manutenção do valor de FPS após irradiação) durante a Avaliação da Estabilidade Normal em t0 (48h da preparação) e por 90 dias (t30, t60 e t90) para as formulações fotoprotetoras adicionadas ou não de Resveratrol e Ácido Ferúlico.

<i>P</i> - valor		0,037		0,005		0,000
BF+RES		55,1±6,1 ^A	23,0±3,0 ^C	381,0±0,0 ^{BC}	379,7±0,6 ^{C_D}	0,809±0,0 ^B 0,727±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,000		0,009		0,001
BF+AF		38,3±8,5 ^B	26,7±4,7 ^{BC}	383,0±0,6 ^A	379,0±0,0 ^D	0,842±0,0 ^A 0,705±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,129		0,001		0,169
BF		21,5±6,4 ^B	23,0±3,0 ^{BC}	381,0±0,0 ^A	379,3±0,6 ^{C_D}	0,792±0,0 ^B 0,717±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,450		0,001		0,003
BF+RES	t60E	45,6±7,3 ^{BC}	26,7±2,5 ^{BC}	380,3±0,6 ^A	379,0±0,0 ^D	0,776±0,0 ^B 0,715±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,047		0,006		0,002
BF+AF		33,3±5,0 ^A	18,0±2,0 ^C	382,7±0,6 ^A	378,7±0,6 ^D	0,843±0,0 ^A 0,699±0,0 ^C
<i>P</i> - valor		0,006		0,006		0,238
BF		24,0±8,7 ^B	20,7±0,3 ^B	383,0±0,6 ^A	379,0±0,0 ^B	0,840±0,1 ^A 0,713±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,863		0,003		0,013
BF+RES	t90A	50,3±3,5 ^A	14,7±0,6 ^B	381,0±0,0 ^A	380,0±0,0 ^B	0,784±0,0 ^A 0,716±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,000		0,005		0,000
BF+AF		44,0±4,6 ^A	15,0±6,2 ^{AB}	382,7±0,6 ^A	378,7±0,0 ^B	0,817±0,0 ^A 0,704±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,000		0,007		0,000
BF		24,3±4,9 ^{BC}	25,0±6,6 ^{BC}	382,7±0,6 ^A	379,0±0,0 ^B	0,820±0,0 ^A 0,717±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		1,000		0,000		0,000
BF+RES	t90G	55,0±11,3 ^A	14,0±5,7 ^C	380,7±0,6 ^A	378,0±0,6 ^B	0,784±0,0 ^A 0,737±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,002		0,013		0,033
BF+AF		38,7±8,1 ^B	27,3±2,9 ^{BC}	382,7±0,6 ^A	378,7±0,6 ^B	0,843±0,0 ^A 0,696±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,089		0,000		0,000
BF		17,7±3,8 ^B	20,0±2,0 ^B	383,0±0,0 ^A	378,7±0,6 ^B	0,796±0,0 ^A 0,689±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,059		0,000		0,001
BF+RES	t90 E	43,3±2,5 ^A	16,7±1,2 ^B	381,0±0,0 ^A	380,0±0,0 ^B	0,775±0,0 ^A 0,735±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,000		0,000		0,015
BF+AF		39,0±4,4 ^A	15,7±3,8 ^B	383,0±0,0 ^A	377,7±0,6 ^B	0,817±0,0 ^A 0,640±0,0 ^B
<i>P</i> - valor		0,000		0,000		0,000

Legenda: **BF** (BMBM = *Butyl methoxydibenzoylmethane* 5,0%p/p + **EHMC:** *Ethylhexyl methoxycinnamate* 10,0%p/p; **RES:** Resveratrol 3,0% p/p; **AF:** Ácido Ferúlico 3,0%p/p; **DP:** desvio padrão; **t** = 48 h após o preparo das formulações. Resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. **FPS** = Fator de Proteção Solar; λ_c = comprimento de onda crítico; **UVA/ UVB** = razão UVA e UVB. **A:** 20,0 ± 2,0 °C; **G:** 5,0 ± 2,0 °C; **E:** 45,0 ± 2,0 °C. Resultados que não compartilharam a mesma letra são estatisticamente diferentes.

Figura 28. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade das formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $20,0 \pm 2,0$ °C (A).

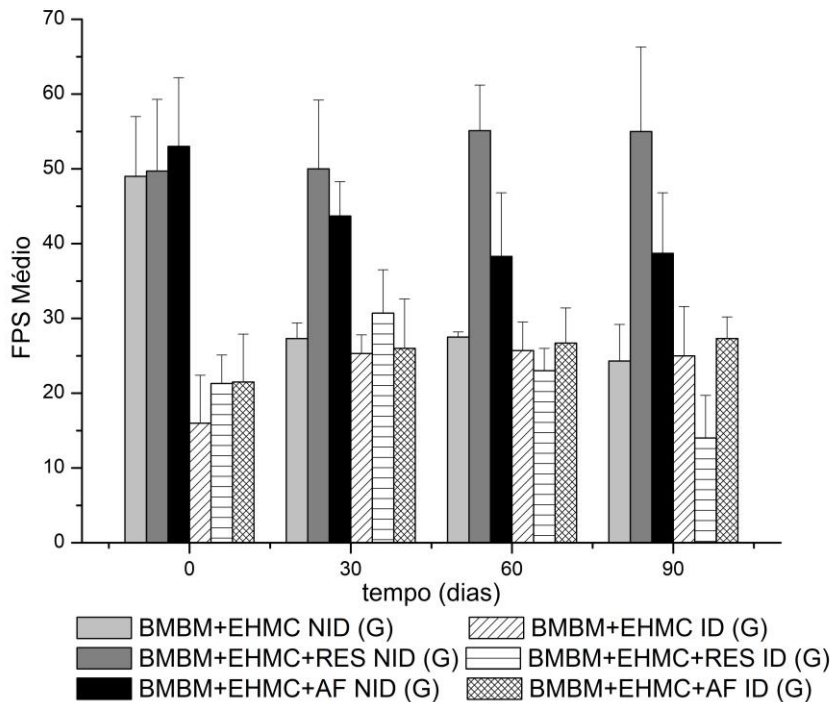


Legenda: **BMBM:** *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p; **EHMC:** *Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0%p/p; **AF:** Ácido Ferúlico 1,0%p/p; **RES:** Resveratrol 3,0%p/p; **t₀** = 48 h do preparo das formulações; **NID:** Não irradiado; **ID:** irradiado. **A:** condição ambiental de $20,0 \pm 2,0$ °C; **t₀** = 48 horas após preparo das formulações. Os resultados foram expressos na média de 3 determinações.

O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{30E}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 46,94% para **BF**; 1,81% para **BF+RES** e de 49,06% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre **BF+RES** e as outras formulações por não compartilharem a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base. Na condição de estufa os valores de FPS caíram, o que é esperado devido a aceleração dos processos de instabilidade e degradação dos componentes da formulação (FREIRE, 2019; BRASIL, 2004) (**Tabela X, Figura 29**).

O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{60A}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 27,96% para **BF**, 12,68% para **BF+RES** e de 10,75% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as outras formulações por não compartilharem a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela X, Figura 29**). O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{60G}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 43,88% para **BF**; 2,65% para **BF+RES** e de 27,33% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações por não compartilharem a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela X, Figura 29**).

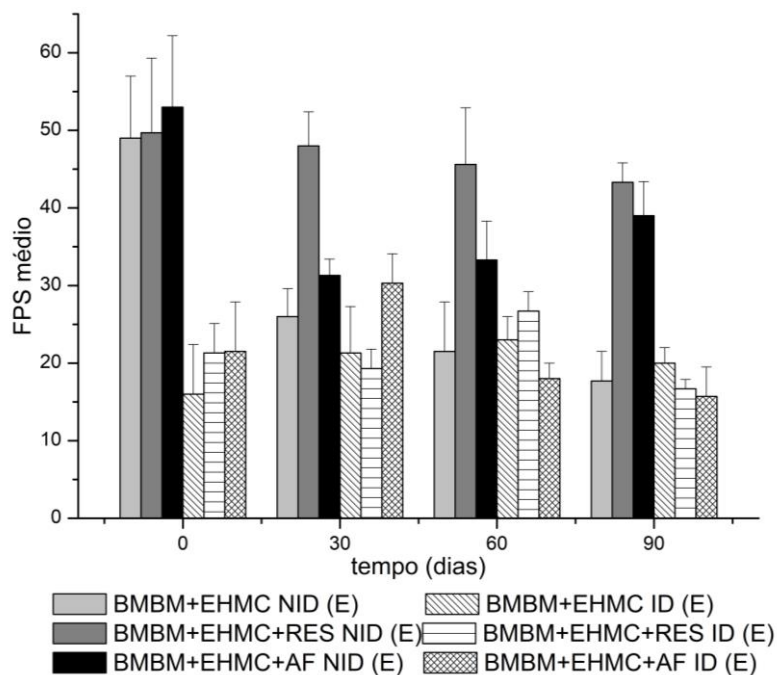
Figura 29. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade de formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $5,0 \pm 2,0$ °C (G).



Legenda: **BMBM:** *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p; **EHMC:** *Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0%p/p; **AF:** Ácido Ferúlico 1,0%p/p; **RES:** Resveratrol 3,0%p/p; **t₀** = 48 h do preparo das formulações; **NID:** Não irradiado; **ID:** irradiado. **G:** condição ambiental de $5,0 \pm 2,0$ °C; **t₀** = 48 horas após preparo das formulações. Os resultados foram expressos na média de 3 determinações.

O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{60E}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 56,12% para **BF**; 8,25% para **BF+RES** e de 37,17% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações por não compartilharem a mesma letra. O que indica que nesta condição a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base. Na condição da estufa os valores de FPS caíram, o que é esperado devido a aceleração dos processos de instabilidade e degradação dos componentes da formulação (FREIRE, 2019; BRASIL, 2004) (**Tabela X, Figura 30**).

Figura 30. Avaliação da fotoproteção e da fotoestabilidade de formulações durante o teste de estabilidade normal antes e pós irradiação na condição ambiental de $45,0 \pm 2,0$ °C (E).



Legenda: **BMBM:** *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p; **EHMC:** *Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0%p/p; **AF:** Ácido Ferúlico 1,0%p/p; **RES:** Resveratrol 3,0%p/p; **t₀** = 48 h do preparo das formulações; **NID:** Não irradiado; **ID:** irradiado. **E:** condição ambiental de $45,0 \pm 2,0$ °C; **t₀** = 48 horas após preparo das formulações. Os resultados foram expressos na média de 3 determinações.

O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{90A}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 51,02% para **BF**, 1,21% para **BF+RES** e de 16,98% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para **BF** em relação as formulações **BF+RES** e **BF+AF**, pois não compartilharam a mesma letra, indicando que nesta condição, a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela IX, Figura 28**). O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{90G}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi 50,40% para **BF**; 12,24% para **BF+RES** e 21,02% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações por não compartilharem a mesma letra, indicando que nesta condição, a adição de **RES** favoreceu a fotoproteção da base (**Tabela IX, Figura 29**).

O percentual de variação de FPS sem irradiação no **t_{90E}** em relação a formulação **BF** no **t₀** foi de 63,80% para **BF**; 11,63% para **BF+RES** e de 20,40% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para **BF** em relação as formulações **BF+RES** e **BF+AF**, pois não compartilharam a mesma letra. O que indica que nesta condição, a adição de **RES** e **AF** favoreceram a fotoproteção da base. Na condição da estufa com 90 dias, foi a condição que apresentou os menores valores de FPS, o que é esperado devido a aceleração dos processos de instabilidade e degradação dos componentes da formulação com o calor e tempo (FREIRE, 2019; BRASIL, 2004) (**Tabela IX, Figura 30**).

Após a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t30A** em relação a formulação **BF** não irradiada no **t0** foi de 65,31% para **BF**, 39,64% para **BF+RES** e de 67,92% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações não irradiadas e irradiadas, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Além disso, houve diferença significativa entre a formulação **BF+RES** e as outras formulações, por não compartilharem a mesma letra (**Tabela IX, Figura 28**). Na condição de **t30G** pós irradiação, a variação da **BF** em relação ao **t0** foi 48,37% para **BF**; 38,23% para **BF+RES** e 50,94% para **BF+AF**. Houve diferença significativa na comparação antes e pós irradiação para as formulações **BF+RES** e **BF+AF**, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Além disso, houve diferença significativa entre a formulação **BF+RES** e as outras formulações, por não compartilharem a mesma letra, o que indica que **BF+RES** apresentou uma situação melhor em relação as outras formulações pós irradiação (**Tabela IX, Figura 29**).

Com a exposição a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t30E** em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 56,53% para **BF**, 61,17% para **BF+RES** e de 42,83% para **BF+AF**. Houve diferença significativa entre as formulações não irradiadas e irradiadas, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Não houve diferença significativa entre as formulações porque compartilharam a mesma letra, o que indica que nesta condição a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora (**Tabela IX, Figura 30**).

Após a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t60A** em relação a formulação **BF** não irradiada no **t0** foi de 38,77% para **BF**, 33,60% para **BF+RES** e de 67,92% para **BF+AF**. Houve diferença significativa antes e pós irradiação para as formulações **BF+RES** e **BF+AF**, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Além disso, houve diferença significativa entre as formulações por não compartilharem a mesma letra (**Tabela IX, Figura 28**). Na condição de **t60G** pós irradiação, a variação da **BF** em relação ao **t0** foi 47,55% para **BF**; 53,72% para **BF+RES** e 49,62% para **BF+AF**. Houve diferença significativa na comparação antes e pós irradiação para as formulações **BF** e **BF+RES**, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Além disso, houve diferença significativa entre a formulação **BF+AF** e as outras formulações, por não compartilharem a mesma (**Tabela IX, Figura 29**).

Com a exposição a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t60E** em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 53,06% para **BF**, 46,28% para **BF+RES** e de 66,04% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para as formulações **BF+RES** e **BF+AF** antes e pós irradiação,

valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Houve diferença significativa entre **BF+AF** e as demais formulações porque não compartilharam a mesma letra, o que indica que nesta condição a adição **BF+AF** apresentou o menor valor de FPS (**Tabela IX, Figura 30**).

Após a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t90A** em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 57,75% para **BF**, 70,42% para **BF+RES** e de 69,39% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para as formulações **BF+RES** e **BF+AF** antes e pós irradiação, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **AF** e **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Houve diferença significativa entre **BF+AF** e as demais formulações porque não compartilharam a mesma letra (**Tabela IX, Figura 28**).

Na condição de **t90G** pós irradiação, a variação da **BF** em relação ao **t0** foi 48,97% para **BF**; 71,43% para **BF+RES** e 44,28% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para a formulação **BF+RES** antes e pós irradiação, valor de $p \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **RES** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Houve diferença significativa entre **BF+RES** e as demais formulações pois não compartilharam a mesma letra, indicando que **BF+RES** apresentou o menor valor de FPS (**Tabela IX, Figura 29**).

Com a exposição a irradiação, o percentual de variação de FPS no **t90E** em relação a formulação **BF** no **t0** foi de 59,18% para **BF**, 65,91% para **BF+RES** e de 67,96% para **BF+AF**. Houve diferença significativa para a formulação **BF** antes e pós irradiação, valor de $P \leq 0,05$, indicando que nesta condição, a adição de **RES** e **AF** não favoreceu a fotoestabilidade da base fotoprotetora. Não houve diferença significativa entre as formulações pós irradiação porque compartilharam a mesma letra (**Tabela IX, Figura 30**).

Como sugestão de temperatura de armazenamento, a condição de $20,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (**A**) foi mais adequada, além de conferir praticidade no armazenamento e transporte do produto pelo fabricante e consumidor.

O comprimento de onda crítico (λ_c) permaneceu acima de 370 nm, para todas as formulações, antes e após a irradiação no decorrer da AEN, com manutenção da função de amplo espectro (VELASCO *et al.*, 2011). De acordo com BOOTS THE CHEMISTS LTD. (2014) e COLIPA (2011), a fotoproteção UVA *in vitro* é estabelecida por determinação espectrofotométrica do λ_c , parâmetro físico que indica a qualidade da proteção de amplo espectro ao especificar o comprimento de onda abaixo do qual 90% da cobertura espectral de um fotoprotetor ocorre (absorbância entre 290 e 400 nm). Houve diferença estatisticamente significativa entre as formulações testadas antes e pós irradiação comparando a mesma condição ambiental e tempo, em dias, exceto na condição **t30E** para **BF**. No geral, as formulações compartilharam a mesma letra antes da irradiação. Embora houve diferença significativa, os

valores de λ_c se mantiveram acima de 370nm, o que significa que a adição de antioxidantes não foi relevante para este parâmetro (**Tabela IX**).

Em relação ao parâmetro razão UVA/ UVB houve diferença estatisticamente significativa antes e pós irradiação somente para **BF+AF** em t30G, t30E, t60A, t60G e t60E. O que indica que a adição de **AF** não favoreceu a proteção UVA nessas condições. A diminuição dos valores no decorrer da AEN sugere uma diminuição da proteção UVA. A razão UVA/ UVB diminuiu ao longo dos 90 dias, porém, neste estudo foi considerada adequada, pois esteve compreendida entre $0,6 \leq r < 0,95$ (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2011; MOYAL, 2012) (**Tabela IX**).

5.9. Quantificação dos filtros solares nas formulações fotoprotetoras por qRMN no decorrer da AEN.

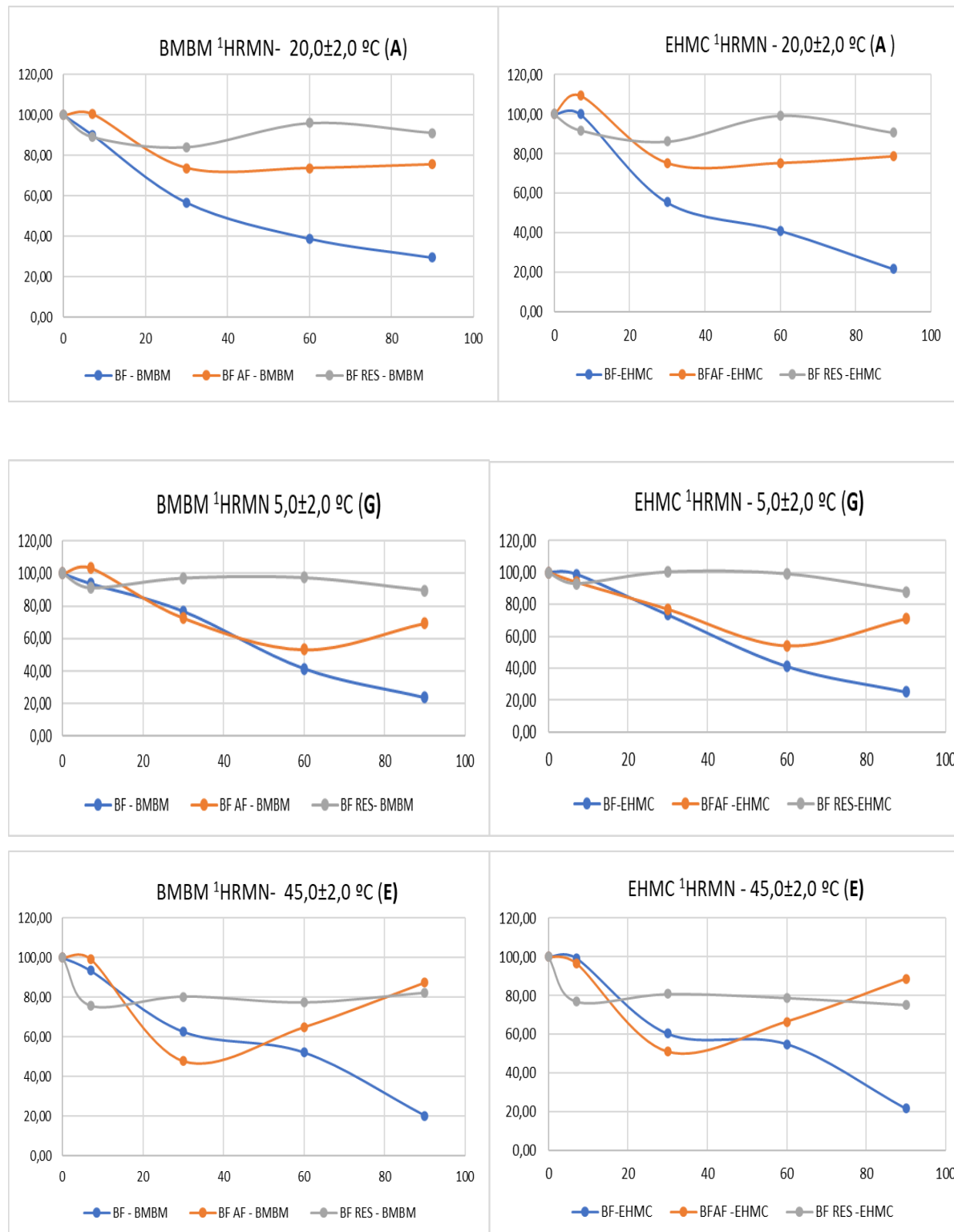
No decorrer dos 90 dias e nas condições ambientais de $5,0 \pm 2,0$ °C; $20,0 \pm 2,0$ °C e $45,0 \pm 2,0$ °C foi quantificado os filtros solares **BMBM** e **EHMC** nas formulações fotoprotetoras **Tabela X** e **Figura 36**.

Tabela X. Quantificação e percentual de conservação dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** por RMN quantitativo nas formulações fotoprotetoras com e sem antioxidantes no decorrer da *Avaliação da Estabilidade Normal*.

tempo (dias)	Condição de armazenamento					
BMBM em BF						
	G	G%	A	A%	E	E%
0	36,74					
7	34,45 ^H	93,70	33,15 ^I	90,22	34,30 ^I	93,40
30	28,21 ^H	76,79	20,88 ^I	56,83	23,00 ^I	62,64
60	15,28 ^H	41,59	14,35 ^I	39,06	19,20 ^I	52,22
90	8,72 ^H	23,74	10,92 ^I	29,72	7,48 ^I	20,37
EHMC em BF						
0	63,35					
7	62,63 ^F	98,87	63,30 ^F	100,00	63,00 ^F	99,37
30	46,56 ^F	73,49	35,15 ^F	55,48	38,30 ^F	60,39
60	26,06 ^F	41,14	26,08 ^F	41,17	34,90 ^F	55,01
90	15,89 ^F	25,09	13,81 ^F	21,81	13,76 ^F	21,72
BMBM em BF+AF						
0	35,30					
7	36,55 ^G	103,54	35,54 ^F	109,05	35,0 ^G	99,20
30	25,69 ^G	72,78	26,05 ^F	75,38	16,09 ^G	47,94
60	18,81 ^G	53,29	26,05 ^F	75,38	22,97 ^G	65,07
90	24,57 ^G	69,61	26,69 ^F	78,75	30,09 ^G	87,54
EHMC em BF+AF						
0	65,22					
7	61,24 ^F	93,89	71,32 ^D	109,35	63,00 ^E	96,58
30	50,25 ^F	77,05	49,16 ^D	75,38	33,30 ^E	51,03
60	35,34 ^F	54,19	49,16 ^D	75,38	43,42 ^E	66,57
90	46,30 ^F	70,99	51,36 ^D	78,75	57,83 ^E	88,67
BMBM em BF+RES						
0	49,14					
7	44,73 ^G	91,03	43,77 ^F	89,07	37,20 ^F	75,67
30	47,74 ^G	97,15	41,26 ^F	83,95	39,05 ^F	80,36
60	47,88 ^G	97,44	47,19 ^F	96,02	38,00 ^F	77,35
90	43,98 ^G	89,51	44,79 ^F	91,15	40,44 ^F	82,30
EHMC em BF+RES						
0	88,42					
7	82,37 ^A	93,16	81,30 ^B	91,95	68,10 ^C	77,06
30	88,93 ^A	100,57	76,26 ^B	86,25	71,50 ^C	80,89
60	87,83 ^A	99,34	87,90 ^B	99,41	69,71 ^C	78,88
90	77,79 ^A	87,98	80,27 ^B	90,79	66,58 ^C	75,30

Legenda: **G**=5,0±2,0 °C; **A**=20,0±2,0 °C; **E**=45,0±2,0 °C; **G%**= percentual de conservação dos filtros na faixa de temperatura de 5,0±2,0 °C; **A%**= percentual de conservação dos filtros na faixa de temperatura de 20,0±2,0 °C; **E%**= percentual de conservação dos filtros na faixa de temperatura de 45,0±2,0 °C; **EHMC**= *Ethylhexyl Methoxycinnamate*; **BMBM**: *Butyl Methoxydibenzoylmethane*; **RES**: Resveratrol; **AF**: Ácido Ferúlico; **BF**: Base fotoprotetora; **BF+AF**: Base fotoprotetora com Ácido Ferúlico; **BF+RES**: Base fotoprotetora com Resveratrol. Valores que não compartilharam uma letra são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey, Valor de P ≤0,05.

Figura 31: Percentual de conservação dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** por RMN quantitativo nas formulações fotoprotetoras com e sem antioxidantes.



Legenda: **EHMC**= *Ethylhexyl Methoxycinnamate*; **BMBM**: =*Butyl Methoxydibenzoylmethane*; **RES**: Resveratrol; **AF**: Ácido Ferúlico; **BF**: Base fotoprotetora; **BF+AF**: Base fotoprotetora com Ácido Ferúlico; **BF+RES**: Base fotoprotetora com Resveratrol; **A**: ambiente; **G**: geladeira, **E**: estufa.

Na quantificação do filtro solar **BMBM** em **BF**, a condição ambiental de geladeira (G) foi significativamente diferente em relação as condições ambientais de ambiente (A) e estufa (E), pois não compartilharam a mesma letra. Houve queda do percentual de conservação de **BMBM** no decorrer da AEN.

Na quantificação do filtro solar **EHMC** em **BF**, não houve diferença significativa entre as condições ambientais testadas (ambiente, geladeira e estufa), pois não compartilharam a mesma letra. Houve queda do percentual de conservação de **EHMC** no decorrer da AEN.

Na quantificação do filtro solar **BMBM** em **BF+AF**, a condição ambiente (A) foi significativamente diferente entre as condições ambientais de geladeira (G) e estufa (E), pois não compartilharam a mesma letra. Houve menor queda do percentual de conservação de **BMBM** em **BF+AF**, no decorrer da AEN em relação a **BF**.

Na quantificação do filtro solar **EHMC** em **BF+AF**, houve diferença significativa entre as condições ambientais testadas (geladeira, ambiente e estufa), pois não compartilharam a mesma letra. Houve menor queda do percentual de conservação de **EHMC** em **BF+AF**, no decorrer da AEN em relação a **BF**.

Na quantificação do filtro solar **BMBM** em **BF+RES**, a condição de geladeira (G) foi significativamente diferente entre as condições de ambiente (A) e estufa (E), pois não compartilharam a mesma letra. Houve menor queda do percentual de conservação de **BMBM** em **BF+RES**, no decorrer da AEN em relação a **BF** e **BF+AF**.

Na quantificação do filtro solar **EHMC** em **BF+RES**, houve diferença significativa entre as condições ambientais testadas (geladeira, ambiente e estufa), pois não compartilharam a mesma letra. Houve menor queda do percentual de conservação de **EHMC** em **BF+RES**, no decorrer da AEN em relação a **BF** e **BF+AF**, exceto na condição de estufa de **BF+AF**.

O percentual de conservação de **BMBM** e **EHMC** nas formulações com os antioxidantes foram mais elevadas em todas condições ambientais (**A**, **G** e **E**) no decorrer da avaliação da AEN, com destaque para a formulação fotoprotetora com Resveratrol, a qual apresentou o maior percentual de conservação. Pinto (2014) obteve também resultados favoráveis com a adição do antioxidante rutina.

5.10. Atividade antioxidante

Antes de avaliar a atividade antioxidante por inibição do radical DPPH[•] foi feita curva analítica de Trolox[®] para verificar a atividade antioxidante equivalente em Trolox[®] (**Figura 32**, **Tabela XI e XII**).

Figura 32: Curva analítica de Trolox[®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres

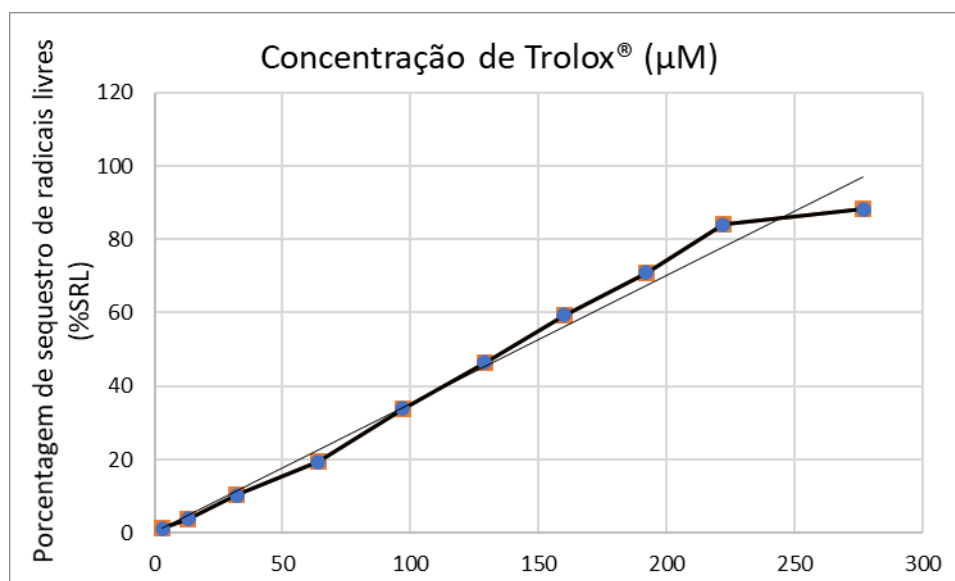


Tabela XI: Equação da reta que relaciona concentração de Trolox[®] e %SRL. **Equação 10.**

Análise da regressão linear Trolox	
Equação da reta:	$y = 0,3497x + 0,1567$ (10)
y =	% sequestro de radicais livres
x =	concentração de Trolox [®] µM
a =	0,3497
b =	+ 0,1567
Coefficiente de correlação angular (R²)	0,984

Tabela XII: Dados utilizados para a construção da curva analítica de Trolox[®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%).

Conc. Trolox [®] (µM)	Abs média ± DP	%SRL média ± DP
3	0,839	1,29±0,95
13	0,818	3,76±0,86
32	0,797	10,23±0,32
64	0,685	19,41±0,09
97	0,562	33,88±0,25
129	0,455	46,47±0,63
160	0,399	59,37±0,47
192	0,248	70,82±0,88

222	0,136	84,00±0,05
277	0,101	88,12±0,12

Legenda: **Conc:** Concentração; **DP:** Desvio Padrão; **Abs média:** Absorbância média (triplicata); **%SRLmédia:** Média dos valores de porcentagem de sequestro de radicais livres.

A atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras foram determinadas pela atividade antioxidante equivalente em concentração de Trolox[®], conforme **item 4.2.10**.

A atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras foram avaliadas no decorrer da AEN (**Tabela XIII**).

Tabela XIII. Atividade antioxidante da base fotoprotetora equivalente em concentração de Trolox[®] ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{g}$) da formulação fotoprotetora testada (triplicata)

T (dias)	Condição de armazenamento		
	5,0±2,0 °C (G)	20,0±2,0 °C (A)	45,0±2,0 °C (E)
Atividade Antioxidante ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{g BF}$)			
0	59,16±7,46 ^E		
7	51,05±18,66 ^G	58,69±6,17 ^E	62,30±5,10 ^C
15	58,45±13,18 ^E	59,16±2,66 ^E	56,83±19,54 ^E
30	42,13±6,21 ^H	40,00±0,53 ^H	52,98±18,00 ^F
60	25,62±13,76 ^K	28,53±1,93 ^L	36,22±10,49 ^I
90	37,34±6,01 ^I	29,89±2,88 ^J	38,37±1,39 ^I
Atividade Antioxidante ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{g BF+AF}$)			
0	260,84±0,01 ^B		
7	263,41±1,96 ^B	264,12±1,64 ^B	263,29±1,23 ^B
15	263,02±2,92 ^B	262,31±4,23 ^B	267,46±0,93 ^B
30	263,37±1,23 ^B	266,03±1,52 ^B	264,39±1,58 ^B
60	264,02±0,56 ^B	262,67±0,56 ^B	264,76±1,19 ^B
90	249,57±17,55 ^B	259,44±3,46 ^B	265,10±4,61 ^B
Atividade Antioxidante ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{g BF+RES}$)			
0	269,38±6,29 ^B		
7	277,20±0,36 ^A	276,76±2,25 ^A	277,40±0,31 ^A
15	268,23±3,63 ^B	271,31±1,17 ^B	270,95±0,90 ^B
30	269,96±4,62 ^B	269,09±4,86 ^B	270,93±3,46 ^B
60	263,69±1,06 ^B	271,15±1,46 ^B	273,68±1,69 ^A
90	268,00±1,02 ^B	254,70±5,66 ^B	260,68±8,20 ^B

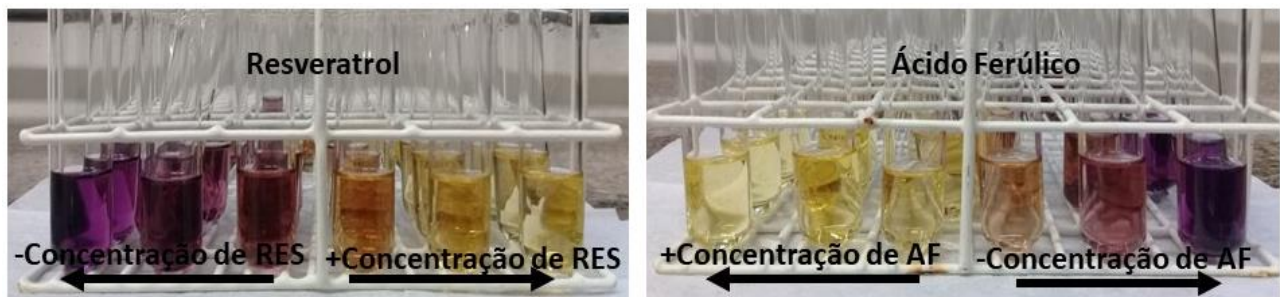
Legenda: t = dias. Valores que não compartilharam a mesma letra são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey, Valor de P ≤0,05.

Houve diferença significativa entre a atividade antioxidante de **BF** em relação a atividade antioxidante de **BF+AF** e **BF+RES**, pois não compartilharam a mesma letra. Essa diferença foi devido a adição dos antioxidantes **AF** e **RES** na base fotoprotetora. No decorrer da AEN não houve diferença significativa da atividade antioxidante para **BF+AF** no decorrer dos 90 dias em todas as condições ambientais (ambiente, geladeira e estufa).

No decorrer da AEN houve diferença significativa entre o **t7** e os demais tempos em dias nas condições ambientais testadas de ambiente, geladeira e estufa para **BF+RES**, pois não compartilharam a mesma letra.

Foram preparadas soluções com os antioxidantes **RES** e **AF** em metanol com concentrações variadas, visando avaliar se a atividade antioxidante é concentração-dependente (**Tabela XIV, Figura 33**).

Figura 33. Inibição do radical DPPH' por Resveratrol e Ácido Ferúlico.



Fonte: obtido pelo autor.

Tabela XIV: Atividade antioxidante das soluções metanólicas com Ácido Ferúlico e Resveratrol em concentrações variadas.

Concentração de Ácido Ferúlico (mg/mL)	Abs média ± DP	Atividade Antioxidante (%)	Atividade Antioxidante (µM Trolox®/ mL)
0,008	0,159±0,004	84,1	238,14±0,00 ^A
0,004	0,412±0,028	58,8	161,07±0,02 ^B
Controle (sol. Metanólica de DPPH')	1,0±0,002	0	0,45±0,00 ^D
Concentração de Resveratrol (mg/mL)	Abs média ± DP	Atividade Antioxidante (%)	Atividade Antioxidante (µM Trolox®/ mL)
0,026	0,109±0,002	89,1	241,38±0,00 ^A
0,020	0,406±0,001	59,4	163,00±0,00 ^B
0,013	0,661±0,032	33,9	85,42±0,03 ^C
Controle (sol. Metanólica de DPPH')	1,0±0,002	0	0,45±0,00 ^D

Legenda: Resultados de atividade antioxidante expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA One-way, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos, valor de $p = 0,05$.

A atividade antioxidante é dose-dependente, pois houve diferença significativa entre as diferentes concentrações testadas. Concentrações inferiores de **AF** apresentaram maior percentual de inibição do radical DPPH[•] em relação ao **RES**.

A atividade anti-radicalar das formulações no t0 foi avaliada a partir do teste com o radical livre DPPH[•] (**Tabela XV**).

Tabela XV. Atividade Antioxidante da Base Fotoprotetora (**BF**) com ou sem os antioxidantes Ácido Ferúlico (**AF**) e Resveratrol (**RES**) por inibição do radical DPPH[•] em concentrações equivalentes de Trolox[®] no t0.

Formulação	% inibição do DPPH [•] \pm DP	Atividade Antioxidante (μ M Trolox [®] / mL)
BF	20,5 \pm 2,6 ^A	59,16 \pm 7,46 ^B
BF+AF	91,0 \pm 0,0 ^B	260,84 \pm 0,01 ^A
BF+ RES	97,0 \pm 0,4 ^C	269,38 \pm 6,29 ^A

Legenda: **BF** – emulsão óleo em água (O/A) com *Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxydi-benzoylmethane* 5,0% p/p; **AF**: Ácido Ferúlico 1,0% p/p; **RES**: Resveratrol 3,0% p/p; **DP**: Desvio padrão. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA One-way, seguido de teste de Tukey, onde médias que não compartilharam a mesma letra são significamente diferentes, com valor de $p \leq 0.05$.

Pelos dados apresentados na **Tabela XV**, a adição de **AF** e **RES** nas formulações fotoprotetoras influenciou os resultados de forma estatisticamente significativa. A **BF** (**BMBM** + **EHMC**) apresentou baixos valores de inibição do radical DPPH[•], média 20,5% ou 59,16 μ M Trolox[®]/ mL, resultado esperado uma vez que não há ingredientes antioxidantes nesta formulação. A adição de Ácido Ferúlico (**AF**) 1,0% p/p na **BF** (**BMBM** + **EHMC**) inibiu o radical DPPH em 91,0% ou 260,84 μ M Trolox[®]/ mL. Esse comportamento era esperado, visto que um dos principais benefícios da adição de compostos fenólicos em formulações tópicas é a sua ação antioxidante. A adição de antioxidantes é benéfica à formulação e à pele, protegendo os filtros químicos em decorrência de sua eficácia (MARTINS *et al.*, 2020; SILVA, MICHNIAK-KOHN, LEONARDI, 2017a). Silva, Michniak-kohn, Leonardi (2017a) mencionaram em sua revisão um trabalho com propriedade fotoprotetora com adição de Resveratrol na formulação em um painel de 15 voluntários.

De acordo com Kikuzaki *et al.* (2002), soluções de 20 μ M de **AF** inibiram 20,0% do radical DPPH[•], sendo considerado um potente antioxidante em comparação aos ferulados e ao

ácido p-cúmarico. Segundo Maurya & Devasagayam (2010), a atividade antioxidante do **AF** foi observada pela inibição do radical DPPH devido à presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$.

De acordo com Bandoniene *et al.* (2002), a porcentagem de inibição do radical DPPH de extratos de plantas metanólicos foi de 72,0% para o ácido ferúlico a $5,0 \times 10^{-5}$ μM antioxidante/ Mol DPPH \cdot .

A atividade antioxidante do **BF** com adição de **AF** foi de 91,0%, sendo maior considerando que sua concentração final foi de $0,4\mu\text{M}$; superior à literatura científica. Em contrapartida, a base fotoprotetora sem o antioxidante inibiu 20,5% do radical DPPH \cdot .

Com a adição de Resveratrol (**RES**) a 3,0% p/ p a inibição do radical DPPH \cdot foi maior do que a adição de **AF** na base fotoprotetora (média de 97,0%). Não houve diferença significativa entre a atividade antioxidantes das formulações **BF+AF** e **BF+RES**, pois compartilharam a mesma letra, considerando as concentrações equivalentes em Trolox $^{\text{®}}$.

Segundo Gulçin (2010), o **RES** possui atividade antioxidante *in vitro* e sequestradora de radicais, obtida por diferentes metodologias, incluindo a atividade sequestrante do DPPH \cdot . A atividade quelante de metais foi percebida pela redução de Fe^{2+} a Fe^{3+} , podendo retardar a formação de produtos de oxidação tóxicos. Resveratrol a $30\mu\text{g/ mL}$ em emulsão de ácido linoléico em tampão fosfato de sódio (0,04 M, pH 7,0) obteve 17,8% de inibição de 50,0% (IC_{50}).

A atividade antioxidante com **RES** (97,0%) na base de fotoproteção (**BF**) deste estudo foi maior do que **BF + AF**, porém a concentração de **RES** em **BF** ($1 \mu\text{M}$) foi maior do que **AF** em **BF** ($0,4 \mu\text{M}$).

5.11. Medidas EPR

Todas as ecdises de pele de cobra (**Figura 34**) foram imersas na solução PCA. Dependendo da formação dos radicais livres que interagem com as amostras, o sinal diminuía.

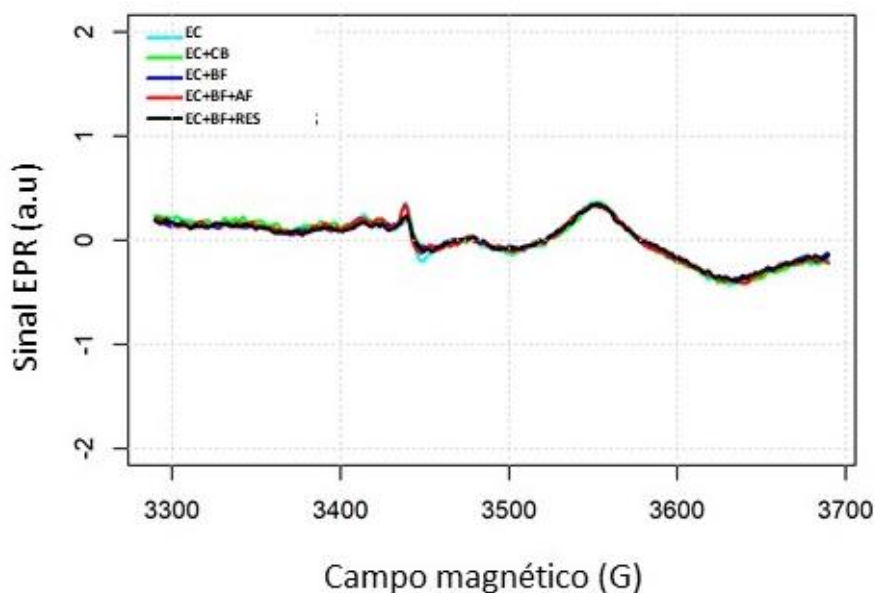
Figure 34. Ecdise de pele de cobra no experimento.



Fonte: obtido pelo autor.

Na **Figura 35**, as amostras antes de serem irradiadas apresentavam o mesmo perfil de radical, sendo apenas **EC** e **EC+BF+AF** com amplitude um pouco maior em relação às demais.

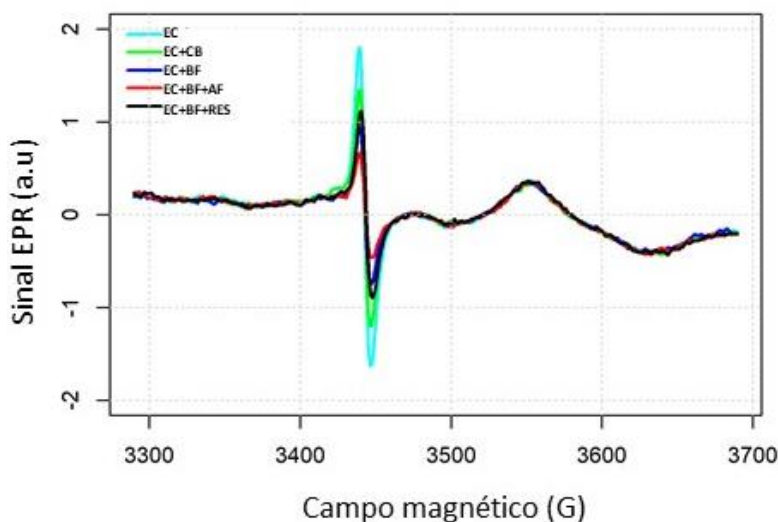
Figura 35. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica antes da irradiação.



Legenda: a.u - unidades arbitrárias; **EC**: Ecdise de pele de Cobra; **EC+CB**: Ecdise de pele de Cobra com Creme Base; **EC+BF**: Ecdise de pele de Cobra com Base Fotoprotetora UVB/ UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p) aditivadas ou não de (1,0% p/p) de *Ferulic Acid* (**EC+BF+AF**) ou (3,0% p/p) de Resveratrol (**EC+BF+RES**)

Após a irradiação, os sinais de todas as amostras aumentaram em amplitude e que o menor sinal em relação à amostra **EC** com a PCA foi o **EC+BF+AF** (Figura 36).

Figura 36. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica após a irradiação.



Legenda: a.u - unidades arbitrárias; **EC**: Ecdise de pele de Cobra; **EC+CB**: Ecdise de pele de Cobra com Creme Base; **EC+BF**: Ecdise de pele de Cobra com Base Fotoprotetora UVB/ UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p) aditivadas ou não de (1,0% p/p) de *Ferulic Acid* (**EC+BF+AF**) ou (3,0% p/p) de Resveratrol (**EC+BF+RES**)

Destacando que os espectros com antioxidantes **AF** e **RES** tiveram seus sinais atenuados. Aproximadamente 72 horas depois, a amostra apenas com pele de cobra e PCA, aumentou

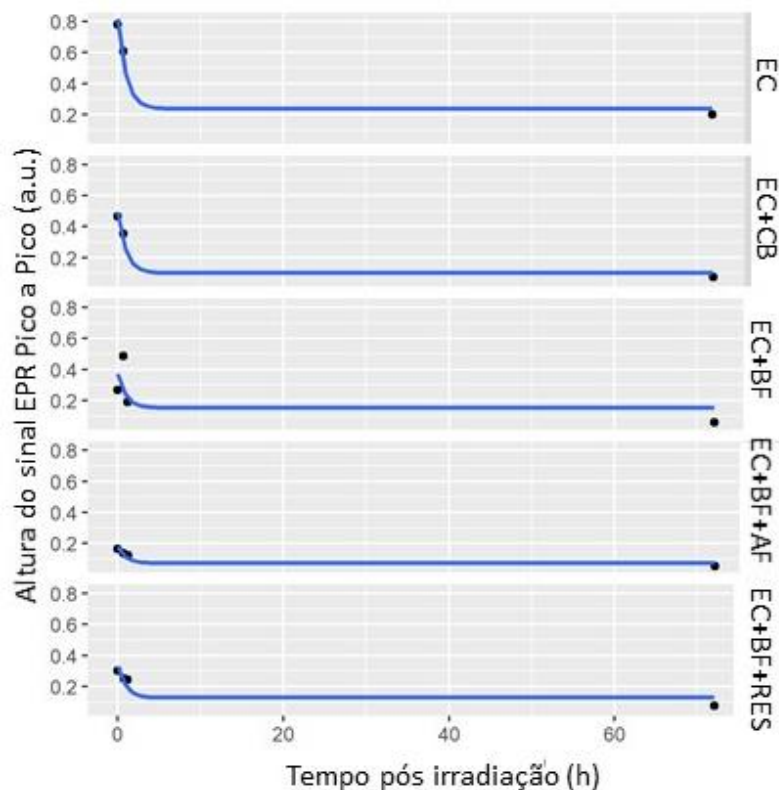
ligeiramente sua amplitude em relação às demais amostras (**Tabela XVI, Figura 37**). Isso significa que, após a exposição à radiação UV, a pele de cobra continuou com a presença de radicais livres, a radiação UVB modificou a cascata inflamatória e produziu espécies reativas de oxigênio (ROS). Com o tempo, os radicais se reequilibram. O fato de os ingredientes das formulações hidratarem e nutrirem, provavelmente protegeu o estrato córneo (MARTINS *et al.*, 2020).

Tabela XVI. Medidas do sinal Pico-a-Pico de decaimento da Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) antes (Não irradiado – **NIR**) e após irradiação (dia 1 e 3).

EC+BF+AF			
tempo (dia)	tempo (h:min:seg)	tempo (h)	Sinal Pico-a-Pico
1	07: 45: 22	NIR	0,75
1	13: 17: 01	IR 0,00	1,13
1	13: 58: 40	IR 0,68	0,93
1	14: 30: 15	IR 1,22	0,94
3	13: 24: 19	IR 72,12	0,79
EC+BF+RES			
tempo (dia)	tempo (h:min:seg)	tempo (h)	Sinal Pico-a-Pico
1	08: 00: 52	NIR	0,74
1	13: 27: 27	IR 0,00	2,01
1	14: 11: 05	IR 0,72	1,68
1	14: 39: 19	IR 1,18	1,64
3	13: 30: 57	IR 72,05	0,82
EC+BF			
tempo (dia)	tempo (h:min:seg)	tempo (h)	Sinal Pico-a-Pico
1	07: 29: 45	NIR	0,74
1	13: 09: 22	IR 0,00	1,69
1	13: 52: 09	IR 0,70	3,05
1	14: 21: 22	IR 1,20	1,20
3	13: 12: 46	IR 72,05	0,79
EC+CB			
tempo (dia)	tempo (h:min:seg)	tempo (h)	Sinal Pico-a-Pico
1	07: 23: 16	NIR	0,78
1	13: 02: 08	IR 0,00	2,55
1	13: 43: 17	IR 0,68	1,94
3	12: 57: 52	IR 71,92	0,78
EC			
tempo (dia)	tempo (h:min:sec)	tempo (h)	Sinal Pico-a-Pico
1	07: 13: 26	NIR	0,79
1	12: 55: 11	IR 0,00	3,43
1	13: 36: 41	IR 0,68	2,67
3	12: 43: 58	IR 71,82	0,92

Legenda: **EC** – Ecdise de pele de cobra, **EC+CB** – Ecdise de pele de cobra com Creme Base, **EC+BF** - Ecdise de pele de cobra com base fotoprotetora UVB/UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxy dibenzoylmethano* 5,0% p/p) aditivadas ou não de (1,0% p/p) Ácido Ferúlico (**EC+BF+AF**) ou (3,0% p/p) Resveratrol (**EC+BF+RES**); **NIR** – Não irradiado.

Figura 37. Medidas de decaimento da Ressonância Paramagnética (EPR) depois de 3 dias de irradiação.



Legenda: **EC** – Ecdise de pele de cobra, **EC+CB** – Ecdise de pele de cobra com Creme Base, **EC+BF** – Ecdise de pele de cobra com Base fotoprotetora UVB/UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p+ *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0% p/p) aditivadas ou não de (1,0% p/p) Ácido Ferúlico (**EC+BF+AF**) or (3,0% p/p) Resveratrol (**EC+BF+RES**).

O sinal pós-irradiação aumentou em amplitude e com o passar das horas e dias diminuiu, aproximando-se do valor da amplitude antes da irradiação. Na amostra **EC + BF** o sinal aumentou após a primeira leitura da amostra irradiada, provavelmente devido à instabilidade da mistura *Butyl Methoxydibenzoylmethane* com *Ethylhexyl Methoxycinnamate*. O perfil de sinal de **BMBM** em enol é próximo ao encontrado por Oguchi-Fujiyama *et al.*, (2012). Entre todas as amostras, **EC+BF+AF** foi o menor sinal após a irradiação UV. De acordo com Martins *et al.* 2020, a natureza fornece uma fonte abundante de substâncias antioxidantes e compostos fenólicos naturais, que demonstram uma ação fotoprotetora tópica, bem como potencial antioxidante, antienvhecimento, hidratante, antipolvente, que é benéfico para a pele.

De acordo com Jia *et al.* (2008), o Resveratrol diminuiu a formação de radicais ânions superóxidos (superóxido de potássio) em solução anidra e o sistema xantina oxidase/ xantina avaliado por método espectrofotométrico enzimático. Esses radicais estão presentes em diversos processos oxidativos patológicos, e com a adição do Resveratrol houve diminuição do sinal do estabilizador do radical 5-(Dietoxifosforil)-5-metilpirrolina-N-óxido (DEPMPO). Com o passar

das horas, ainda foi percebida a presença de radicais livres, mas o sinal decaiu voltando ao perfil antes da irradiação, o que explica o efeito cumulativo da radiação UV na pele.

5.12. Validação bioanalítica

a) Linearidade

A linearidade foi obtida de acordo com o item 4.2.11.b, conforme a Figuras 38 e 39 e Tabelas XVII e XVIII.

Tabela XVII: Curva analítica com os padrões de referência secundários (PD) **BMBM** (Teor = 98,2%) e **EHMC** (Teor = 98,6%) ambos detecção a 325nm.

CtBMBM PD (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)			
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média±dp}
1,0	1,39	1,39	1,39	1,39±0,01
10,0	10,71	10,74	10,56	10,67±0,09
20,0	18,37	18,41	18,44	18,41±0,03
40,0	40,35	40,42	40,31	40,36±0,05
60,0	60,22	60,18	60,12	60,17±0,05
80,00	91,65	91,46	91,55	91,55±0,09

CtEHMC PD (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)			
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média±dp}
1,0	1,0	1,11	1,38	1,16±0,20
20,0	19,66	19,69	19,72	19,69±0,03
60,0	60,86	60,76	60,74	60,78±0,06
100,0	101,35	101,29	101,23	101,29±0,06
150,0	148,86	148,90	148,85	148,87±0,03

Legenda: CtBMBM PD: concentração teórica de **BMBM** padrão; CtEHMC PD: concentração teórica de **EHMC** padrão C¹ a C³: concentração experimental; C_{média±dp} da concentração experimental, (n=3).

Tabela XVIII: Análise de regressão da linearidade da curva analítica de **BMBM** padrão de referência secundário (Teor = 98,2%) e de **EHMC** padrão de referência secundário (Teor = 98,6%) detecção a 325 nm (**Equação 11** e **Equação 12**).

Análise da regressão linear BMBM	
Equação da reta:	$y = 39216x - 88277$ (11)
y	= Área do pico
x	= conc. BMBM ($\mu\text{g/ml}$)
a	= 39216
b	= - 88277
Coefficiente de correlação angular (R^2)	0,990
Análise da regressão linear EHMC	
Equação da reta:	$y = 46502x - 12827$ (12)
y	= Área do pico
x	= conc. EHMC ($\mu\text{g/ml}$)
a	= 46502
b	= -12827
Coefficiente de correlação angular (R^2)	0,999

O método com detecção a 325 nm foi linear e com coeficiente de correlação adequado, próximo a 1,0 (BRASIL, 2003).

Figura 38: Curva analítica de **BMBM** padrão de referência secundário (Teor = 98,2%), detecção a 325 nm.

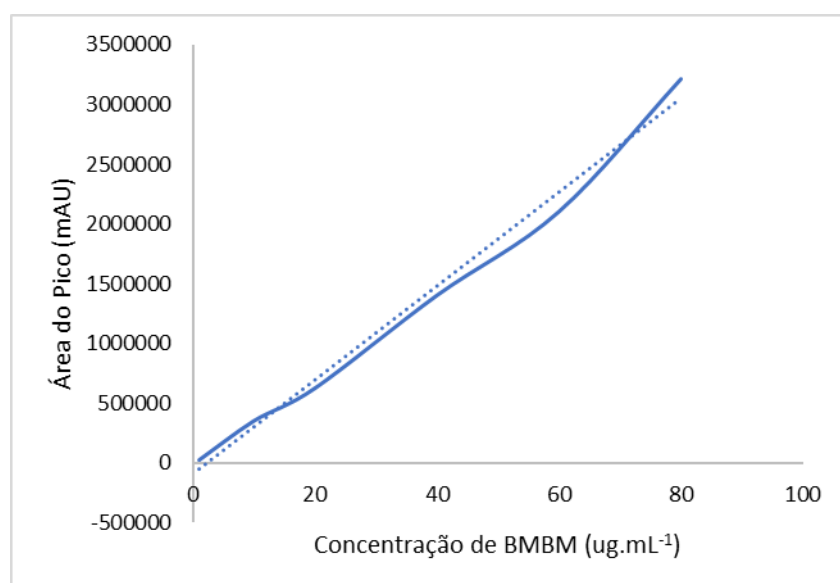
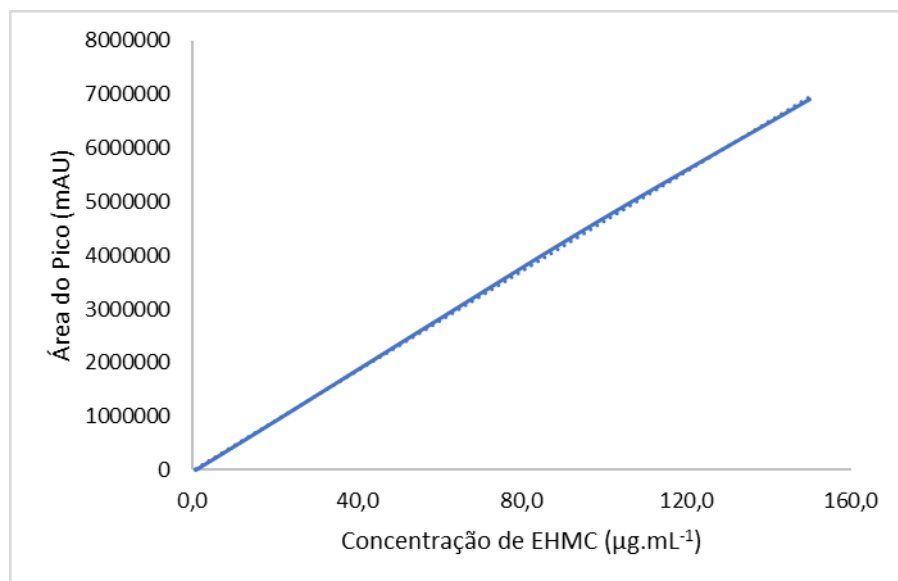


Figura 39: Curva analítica de **EHMC** padrão de referência secundário (Teor = 98,6%), detecção a 325 nm.



b) Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram obtidas de acordo com o item **4.2.11.c**.

A **Tabela XIX** contém os cálculos da precisão intra e interdias, desvio padrão relativo (DPR%) e exatidão dos padrões secundários de **BMBM** e **EHMC**.

Tabela XIX: Precisão e exatidão intradia e interdia, respectivamente, do líquido receptor com pele de orelha de porco, base fotoprotetora e padrões de referência secundário de **BMBM** (Teor = 98,2%) e **EHMC** (Teor = 98,6%), pós 24h de agitação e temperatura à 37 °C.

CtBMBM PD (µg/ml)	Concentração Experimental (µg/ml) 325nm					
	Intradia			Interdia		
	C _{média±dp}	DPR% _{médio}	E%	C _{média±dp}	DPR% _{médio}	E%
28,75	28,11±0,25	0,90	97,77	28,32±0,12	0,33	98,50
38,75	39,36±0,16	0,38	101,57	39,46±0,14	0,37	101,83
48,75	51,82±0,42	0,80	106,30	51,37±0,04	0,10	105,37
CtEHMC PD (µg/ml)	Concentração Experimental (µg/ml) 325nm					
	Intradia			Interdia		
	C _{média±dp}	DPR% _{médio}	E%	C _{média±dp}	DPR% _{médio}	E%
57,50	53,16±0,57	1,08	92,45	52,61±0,50	0,79	91,49
77,50	75,89±0,63	0,83	97,92	75,44±0,67	0,43	97,34
97,50	102,39±0,55	0,54	105,01	101,77±0,55	0,45	104,38

Legenda: CtBMBM PD: concentração teórica de **BMBM** do padrão de referência secundário; CtEHMC PD: concentração teórica de **EHMC** do padrão de referência secundário C_{média±dp}: concentrações experimentais mais ou menos o valor de desvio padrão; DPR%_{médio}: Desvio Padrão Relativo médio; E%: Exatidão.

Os valores de desvio padrão e DPR% foram inferiores a 5% na análise de precisão intra e interdia, o que significa que o método foi preciso. E a exatidão apresentou valores próximos a 100%, logo, estão de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2017, BRASIL, 2003).

c) Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método foi estimado de acordo com o item 4.2.11.d. O LQ estimado para a detecção 325 nm foi de 0,39µg/ml para **BMBM** e de 0,09µg/mL para o **EHMC**, assim, foi considerado que concentrações superiores a este valor são quantificados com precisão e exatidão relacionando com sua sensibilidade (BRASIL, 2003; USP 2013).

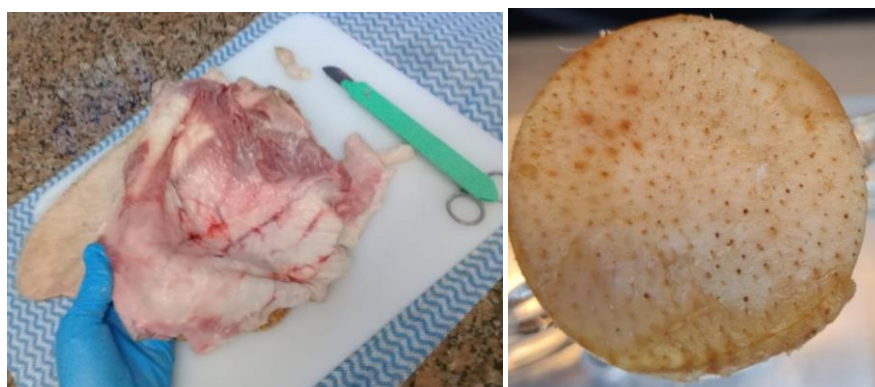
d) Limite de detecção (LD)

O limite de detecção do método foi estimado de acordo com o item 4.2.11.e. O LD estimado para a detecção 325 nm foi de 0,13µg/ml para **BMBM** e 0,03µg/mL para o **EHMC**,

assim, foi considerado que concentrações superiores a este valor são detectados com precisão e exatidão relacionando com a sensibilidade do método (BRASIL, 2003; USP 2013).

Para elaboração do ensaio de permeação cutânea com a orelha de porco (**Figura 40**), submetemos o projeto ao Comitê de ética no uso de animais (CEUA), conforme Anexo I. Por se tratar de material oriundo pós abate do animal em frigorífico, o CEUA apenas tomou ciência e nos cedeu o ofício.

Figura 40 – Dessecção da orelha de porco para teste de permeação cutânea. Separação da cartilagem e aparagem dos pelos.



Fonte: obtido pelo autor.

f) Determinação da condição *sink* e fluído receptor da mistura de filtros solares

Ensaio preliminares foram executados para definir as condições analíticas e bioanalíticas antes do ensaio de permeação cutânea, como a determinação do fluído receptor e da condição *sink*. Esta avalia a saturação do ingrediente ativo no fluído receptor estudado. Na **Tabela XX** tem-se os valores experimentais dos filtros solares, permitindo escolher o melhor fluído receptor e a descrição dos fluídos receptores testados.

Tabela XX. Determinação da Condição *sink* e fluído receptor da mistura de filtros solares em ensaio preliminar.

Amostra	Conc. Exp.	Conc. Exp.	Conc. T.	Conc. T.	% Rec.	% Rec.
	BMBM µg/mL	EHMC µg/mL	BMBM µg/mL	EHMC µg/mL	BMBM	EHMC
A	39,14	108,88	72,67	160,00	53,86 ^B	68,05 ^A
	38,88	108,90	72,67	160,00	53,51 ^B	68,06 ^A
	39,35	109,18	72,67	160,00	54,15 ^B	68,23 ^A
Média±DP	39,12±0,24	108,99±0,17	72,67±0,00	160,00±0,00	53,84±0,32 ^B	68,11±0,10 ^A
B	13,71	36,57	69,3	168,00	19,79 ^D	21,77 ^C
	13,96	36,65	69,3	168,00	20,15 ^D	21,82 ^C
	14,59	36,54	69,3	168,00	21,05 ^D	21,75 ^C
Média±DP	14,09±0,45	36,59±0,06	69,30±0,00	168,00±0,00	20,33±0,65 ^D	21,78±0,04 ^C
Valor de <i>p</i>					0,000	0,000

Legenda: **A**- amostra com **BMBM** (10mg) + **EHMC** (20mg) com 6mL de tampão fosfato pH = 7,4 + 4% p/v de albumina bovina; **B** - amostra com **BMBM** (10mg) + **EHMC** (20mg) com 6 mL de tampão fosfato pH = 7,4 + 4% p/p de albumina bovina + 20% etanol; **Conc. Exp.**– Concentração experimental; **Conc. T.**– Concentração teórica; DP – Desvio Padrão; **% REC**– Percentual de recuperação; **BMBM**= *Butyl methoxydibenzoylmethane*; **EHMC**: *Ethylhexyl methoxycinnamate*. Valores que não compartilharam a mesma letra são significativamente diferentes.

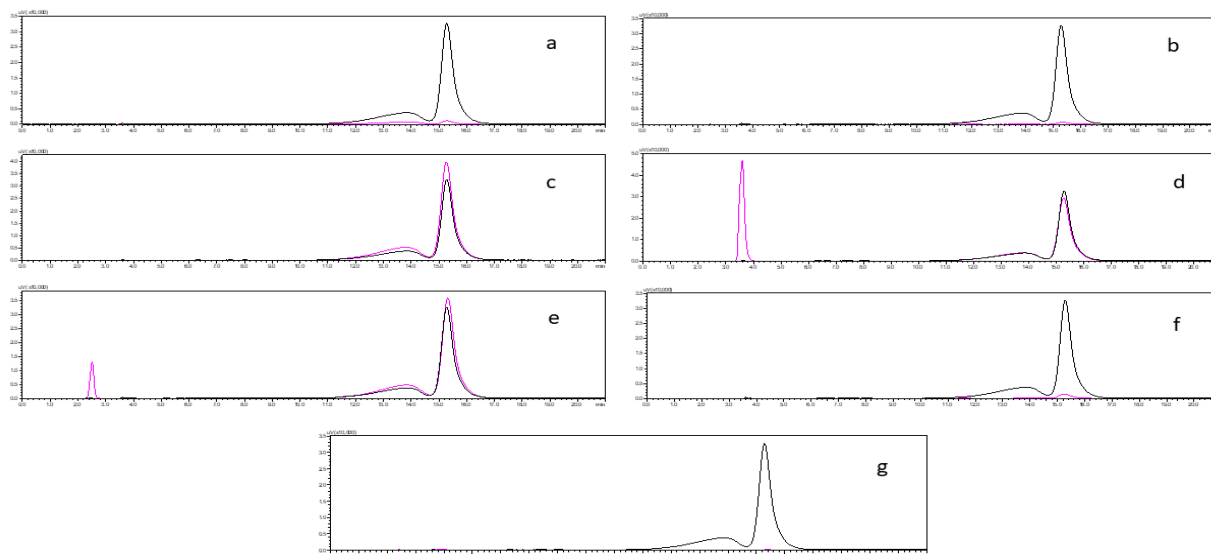
Neste trabalho, o fluído receptor escolhido foi a amostra identificada como A, ou seja, o líquido receptor com tampão fosfato fosfato pH = 7,4 + 4% p/v albumina bovina. Este apresentou maior percentual de recuperação dos filtros **BMBM** (53,84%) e **EHMC** (68,11%) em relação ao fluído receptor, que continha tampão fosfato fosfato pH = 7,4 + 4% p/v albumina bovina + 20% de etanol, **BMBM** (20,33%) e **EHMC** (21,78%). Não houve compartilhamento da mesma letra, o que significa que as soluções testadas são significativamente diferentes. A condição *sink* ideal é quando a concentração do ingrediente ativo não atinja valores >10% da sua saturação (FREIRE *et al.*, 2019; RUELA *et al.*, 2016). Neste experimento houve diferença estatística significativa entre os dois meios, com valor de $p \leq 0,05$. O maior percentual de recuperação está relacionado a uma maior solubilidade destes filtros neste meio. O etanol não melhorou a solubilidade dos filtros no tampão com a albumina bovina.

g) Seletividade: pesquisa de interferentes

Os cromatogramas apresentados na **Figura 41** indicaram que não houveram interferentes na leitura dos filtros químicos **BMBM** e **EHMC**.

A seletividade analítica do método para os filtros solares em estudo foi avaliada e relatada por Garcia (2019), sendo empregada como ponto de partida e confirmada pelos resultados obtidos neste trabalho. Os picos não se sobrepueram, o que indica que o fluído receptor, os ingredientes do creme base, os componentes da fita e da pele da orelha de porco, não interferiram na leitura dos filtros solares. Os picos dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** se sobrepueram aos picos dos mesmos filtros solares na base fotoprotetora (**BF**), o que é esperado.

Figura 41. Cromatogramas obtidos na pesquisa de interferentes, obtidos após 24 horas do teste de permeação cutânea, empregando a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.



Legenda: **a:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) com fluído receptor (rosa); **b:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e creme base (rosa); **c:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e base fotoprotetora (rosa); **d:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e **BF+RES** (rosa); **e:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e **BF+AF** (rosa); **f:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e Fita do *tape stripping* (rosa); **g:** filtros solares **BMBM** e **EHMC** (preto) e a pele de orelha de porco (**EPI+DERME**) (rosa).

Como os resultados preliminares foram satisfatórios prosseguiu-se para o ensaio de permeação cutânea (**Figura 42**).

Figura 42. Célula de difusão de Franz com orelha de porco e formulações fotoprotetoras para ensaio de permeação cutânea.



Fonte: obtido pelo autor.

h) Recuperação dos filtros solares

Seguindo os ensaios preliminares, na **Tabela XXI**, encontram-se os valores de recuperação dos filtros solares químicos **BMBM** e **EHMC**, que foram adicionados na solução receptora com formulação fotoprotetora e a pele de orelha de porco. O ensaio de recuperação do padrão secundário nas condições citadas anteriormente contribuíram para a validação bioanalítica da metodologia empregada.

Os resultados foram considerados adequados porque permaneceram na faixa de 80 a 120% (FDA, 2018).

Tabela XXI. Recuperação dos filtros solares químicos adicionados em concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), na presença de líquido receptor com base fotoprotetora e pele de orelha de porco.

AMOSTRA	Conc. T. BMBM µg/mL	Conc. T. EHMC µg/mL	Conc. Exp. BMBM µg/mL	Conc. Exp. EHMC µg/mL	% Rec. BMBM	% Rec. EHMC
<i>BF+RECEPTOR</i>	9,60	19,55	8,16	16,47	84,98	84,27
<i>ALBUMINA+</i>	9,91	19,28	9,23	17,42	93,14	90,35
<i>CQB+PELE t24h</i>	9,85	19,08	8,59	16,03	87,21	84,01
<i>Média±DP</i>	9,79±0,16	19,30±0,24	8,66±0,38	16,64±0,52	88,46±3,13	86,21±2,76
<i>BF+RECEPTOR</i>	18,69	35,37	20,58	38,79	110,15	109,66
<i>ALBUMINA+</i>	18,18	35,86	21,60	39,56	118,86	110,31
<i>CQM+PELE t24h</i>	17,87	35,27	21,62	39,76	121,00	112,73
<i>Média±DP</i>	18,24±0,41	35,50±0,32	21,27±0,46	39,37±0,39	116,59±4,35	110,90±1,22
<i>BF+RECEPTOR</i>	29,28	56,51	33,92	65,12	115,86	115,23
<i>ALBUMINA+</i>	29,40	56,70	35,74	66,50	121,57	117,27
<i>CQA+PELE t24h</i>	29,82	58,22	35,33	66,01	118,49	113,38
<i>Média±DP</i>	29,50±0,28	57,14±0,94	35,00±0,72	65,87±0,50	118,64±1,95	115,28±1,32

Legenda: **BF** – Base fotoprotetora UVB/UVA - *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (**EHMC**) 10,0% p/p + *Butyl Methoxy dibenzoylmethano* (**BMBM**) 5,0% p/p); **Conc. EXP.** – Concentração experimental; **Conc. T** – Concentração total; **% REC** – Percentual de recuperação; **DP** – Desvio Padrão; **t24h** – alíquota retirada após 24h.

i) **Avaliação da Penetração/ Permeação na orelha de porco**

Na **Tabela XXII**, encontram-se as concentrações dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** em cada compartimento estudado.

Tabela XXII: Concentração dos filtros solares *Butyl Methoxydibenzoylmethane* (**BMBM**) e *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (**EHMC**) presente nos compartimentos do experimento. As formulações testadas foram: base fotoprotetora, base fotoprotetora com ácido ferúlico (**AF**) e base fotoprotetora com Resveratrol (**RES**).

Base Fotoprotetora (BF)				
Localização	Conc. Exp. BMBM $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	Conc. Exp. EHMC $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	%Rec. BMBM$\pm\text{DP}$	%Rec. EHMC$\pm\text{DP}$
<i>Tampa de vidro+Acrílico</i>	68,03 \pm 1,90 ^A	137,09 \pm 14,85 ^A	57,06 \pm 3,83 ^A	56,82 \pm 3,85 ^A
<i>Swab</i>	41,87 \pm 5,70 ^B	84,62 \pm 14,10 ^B	33,32 \pm 9,93 ^B	35,59 \pm 10,24 ^B
1 ^a Fita	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
14 Fitas	2,40 \pm 0,03 ^A	0,81 \pm 0,09 ^A	1,84 \pm 0,02 ^A	0,31 \pm 0,03 ^A
Epid.+Derme	2,87 \pm 0,14 ^A	1,59 \pm 0,49 ^B	2,20 \pm 0,12 ^A	0,61 \pm 0,19 ^B
Líqu. Receptor t4h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,34 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
Líqu. Receptor t24h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
Base Fotoprotetora com Resveratrol (BF+RES)				
Localização	Conc. Exp. BMBM $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	Conc. Exp. EHMC $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	%Rec. BMBM$\pm\text{DP}$	%Rec. EHMC$\pm\text{DP}$
<i>Tampa de vidro+Acrílico</i>	60,14 \pm 1,65 ^B	125,43 \pm 4,60 ^B	46,23 \pm 0,90 ^B	48,19 \pm 0,76 ^B
<i>Swab</i>	40,15 \pm 1,29 ^B	84,03 \pm 3,39 ^B	31,34 \pm 0,66 ^B	32,80 \pm 1,11 ^B
1 ^a Fita	0,00 \pm 0,00 ^A	1,10 \pm 0,07 ^B	0,00 \pm 0,00 ^A	0,45 \pm 0,03 ^B
14 Fitas	0,00 \pm 0,00 ^B	0,78 \pm 0,11 ^A	0,00 \pm 0,00 ^B	0,33 \pm 0,05 ^A
Epid.+Derme	0,53 \pm 0,05 ^B	2,92 \pm 0,28 ^A	0,41 \pm 0,04 ^B	1,14 \pm 0,11 ^A
Líqu. Receptor t4h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
Líqu. Receptor t24h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
Base Fotoprotetora com Ácido Ferúlico (BF+AF)				
Localização	Conc. Exp. BMBM $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	Conc. Exp. EHMC $\mu\text{g/mL}\pm\text{DP}$	%Rec. BMBM$\pm\text{DP}$	%Rec. EHMC$\pm\text{DP}$
<i>Tampa de vidro+Acrílico</i>	53,77 \pm 0,67 ^C	116,26 \pm 4,14 ^B	40,84 \pm 0,17 ^C	44,14 \pm 1,21 ^C
<i>Swab</i>	63,91 \pm 3,09 ^A	134,69 \pm 5,88 ^A	50,02 \pm 3,44 ^A	52,66 \pm 2,03 ^A
1 ^a Fita	0,00 \pm 0,00 ^A	0,45 \pm 0,02 ^C	0,00 \pm 0,00 ^A	0,18 \pm 0,00 ^C
14 Fitas	0,00 \pm 0,00 ^B	1,02 \pm 0,09 ^A	0,00 \pm 0,00 ^B	0,40 \pm 0,04 ^A
Epid.+Derme	0,00 \pm 0,00 ^C	1,56 \pm 0,12 ^B	0,00 \pm 0,00 ^C	0,61 \pm 0,06 ^B
Líqu. Receptor t4h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A
Líqu. Receptor t24h	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A	0,00 \pm 0,00 ^A

Legenda: **BF** – Base fotoprotetora UVB/UVA (*Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0% p/p + *Butyl Methoxy dibenzoylmethano* 5,0% p/p); **BF+AF** – Base fotoprotetora + (1,0% p/p) Ácido Ferúlico; **BF+RES** – Base fotoprotetora + Resveratrol (3,0% p/p); **Líqu.** – Líquido; **Líqu. Receptor** – tampão fosfato pH 7,4 + 4% albumina bovina; **Epid.** – Epiderme; **DP** – Desvio Padrão. Resultados que compartilham a mesma letra são significativamente iguais quando comparado o mesmo

compartimento entre as formulações fotoprotetoras testadas.

No ensaio de permeação cutânea, na tampa de vidro+acrílico e no *swab*, verificou-se a maior concentração dos filtros solares **BMBM** e **EHMC**, pois na tampa de vidro+acrílico ficou o resíduo da formulação. Como o *swab* é utilizado para retirar o excesso da formulação da pele antes de remover o estrato córneo com as fitas, justificamos a concentração elevada. Verificou-se que a técnica utilizada foi efetiva na remoção da formulação, pois a avaliação para todas, após a permeação, indicou ausência ou baixa concentração dos filtros solares na primeira fita (FREIRE *et al.*, 2019).

Na amostra **BF+AF** houve maior concentração de filtros no *swab* em relação as outras formulações, com 63,91µg/mL para o **BMBM** e 134,69µg/mL para o **EHMC**. Provavelmente, essa resposta decorreu do fato da adição do ácido ferúlico (**AF**) ocasionar maior fluidez na formulação em relação as demais testadas.

O limite de quantificação do método foi 0,39µg/mL para o **BMBM** e 0,09µg/mL para o **EHMC**; o de detecção foi 0,13µg/mL para o **BMBM** e 0,03µg/mL para o **EHMC**. A concentração dos filtros solares presentes nas fitas, epiderme + derme e líquido receptor foram superiores aos limites de quantificação e de detecção do método, logo, os resultados obtidos foram confiáveis.

No estrato córneo (14 fitas) houve menor concentração de **BMBM** nas formulações **BF+AF** (0,00µg/mL) e **BF+RES** (0,00µg/mL) em relação a **BF** (2,40µg/mL). Houve diferença significativa entre **BF** e as formulações adicionadas de antioxidantes (**BF+RES** e **BF+AF**) porque não compartilharam a mesma letra. Houve menor concentração de **BMBM** na formulação **BF+RES** (0,78µg/mL) em relação as formulações **BF+AF** (1,02µg/mL) e **BF** (0,81µg/mL). Porém, não houve diferença significativa para o **EHMC** entre as formulações testadas.

Na **EPI+DERME** houve menor concentração de **BMBM** no ensaio de permeação cutânea para a formulação **BF+AF** (0,00µg/mL) em relação a **BF** (2,87µg/mL) e **BF+RES** (0,53µg/mL). Houve diferença significativa para **BMBM** entre as formulações fotoprotetoras testadas.

Na **EPI+DERME** houve menor concentração de **EHMC** no ensaio de permeação cutânea para a formulação **BF+AF** (1,56µg/mL) em relação a **BF** (1,59µg/mL) e **BF+RES** (2,92µg/mL). Houve diferença significativa para **EHMC** entre as formulações fotoprotetoras (**BF+AF** e **BF**) em relação a **BF+RES**. Isso pode ser explicado devido o **RES** ser pouco

solúvel em água, < 0,05 mg/mL, atraindo o filtro **EHMC** por afinidade química (DELMAS *et al.*, 2011). No ensaio de análise térmica foi observado que o filtro **EHMC** solubilizou **RES**.

Em síntese, a adição de **AF** e **RES** na base fotoprotetora, diminui a concentração de **BMBM** na epiderme viável + derme e no estrato córneo, com destaque para **BF+AF**. No ensaio de análise térmica houve interação física entre **BMBM** e **AF**, o que significa que essa combinação é vantajosa para segurança e eficácia em formulação fotoprotetora.

Os filtros solares **BMBM** e **EHMC** não foram quantificados no líquido receptor com 4 e 24h (0,00µg/mL) nas formulações testadas. Não houve diferença significativa entre as formulações, o que indicou que todas podem ser consideradas seguras (FREITAS, 2013; FREI-TAS *et al.*, 2015). As concentrações de **EHMC** no estrato córneo (14 fitas) e no líquido receptor nas três formulações foram próximas ao estudo de permeação de JIMÉNEZ *et al.* (2004).

De acordo com Klimova, Hojerov, Berankov (2015), os filtros **BMBM** e **EHMC** em seu estudo, estiveram dentro da margem de segurança no ensaio de permeação cutânea porque foram obtidos valores superiores a 100. Este valor foi obtido estimando na dose diária de exposição sistêmica dos filtros UV para humanos com a aplicação de emulsão água em óleo contendo 10% de **EHMC** e 5% de **BMBM** em pele humana (mg/kg - peso corpóreo/dia) com 24h pós exposição de 6h da pele a esse fotoprotetor (0,5mg/cm²). Os autores obtiveram 33µg/kg – peso corpóreo/dia de **EHMC** e 34µg/Kg - peso corpóreo/dia de **BMBM**, valores muito superiores em relação ao encontrado na epiderme + derme e líquido receptor no presente estudo. Klimova, Hojerov, Berankov (2015), quantificaram estes filtros solares na mesma concentração em emulsão óleo em água nas camadas da pele e obtiveram após 18h de permeação 5,5µg/cm² de **EHMC** na epiderme + derme e 0,9µg/cm² no líquido receptor. Em relação ao **BMBM** obtiveram 3,6µg/cm² na epiderme + derme e no líquido receptor o resultado foi inferior ao limite de quantificação do método dos autores. Os resultados obtidos no presente estudo de permeação cutânea foram inferiores aos obtidos por Klimova, Hojerov, Berankov (2015), o que nos leva a concluir que as formulações testadas podem ser consideradas seguras pela baixa permeação cutânea dos filtros **EHMC** e **BMBM** e segura quanto a eficácia fotoprotetora, que ocorre na superfície cutânea.

6. CONCLUSÕES

Os espectros e a quantificação por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio permitiram concluir que a adição de Resveratrol (**RES**) em solução com os filtros **BMBM** e **EHMC** preservou mais a forma *trans* do filtro **EHMC** (constante de equilíbrio da forma *trans*

por *cis* = 30,65). Este comportamento é benéfico para a eficácia fotoprotetora por meio da fotoestabilidade do **EHMC**, filtro UVB. A adição do ácido ferúlico (**AF**), também preservou a forma *trans* do filtro **EHMC**, porém de forma menos intensa (constante de equilíbrio da forma *trans* por *cis* = 7,71).

No ensaio de análise térmica por meio da técnica de TG foi possível observar que os filtros solares **BMBM** e **EHMC** indicaram alta estabilidade térmica. A associação das técnicas (TG e DSC) permitiu obter evidências de interação química na mistura **EHMC** + **AF** e **BMBM** + **RES**. Esses resultados confirmaram que a estabilidade térmica, a eficácia fotoprotetora e antioxidante das formulações podem ser comprometidas para as misturas citadas anteriormente. Nas demais misturas **EHMC** + **RES** e **BMBM** + **AF**, houve interação física. Na mistura **EHMC** + **RES** houve solubilização do **RES** com provável biodisponibilidade deste, sendo possível formular produtos multifuncionais com ação fotoprotetora e antioxidante. Este trabalho indicou que cada filtro solar requer um antioxidante específico para potencializar a eficácia da formulação. A degradação do **AF** foi retardada em sua mistura com *Butyl Methoxy dibenzoylmethano* (**BMBM**), que poderia atuar como protetor térmico do **AF** na mistura, mesmo com a antecipação da fusão. Na formulação, outras interações com os componentes podem ser esperadas.

Houve supressão da fluorescência do **BMBM** com a adição de **RES**, evidenciando-se supressão do estado singleto do filtro **BMBM** e indicando que **RES** pode auxiliar na fotoestabilidade de **BMBM** por este mecanismo. O mesmo não ocorreu com **AF**.

No ensaio de FRET os antioxidantes **RES** e **AF** conseguiram absorver a energia emitida pelo **EHMC**, evitando a passagem pelo estado tripleto e favorecendo a fotoestabilidade deste filtro solar. Em relação ao **BMBM** não houve intercepção, indicando que estes antioxidantes não estão aptos à absorver a energia emitida por **BMBM** por este mecanismo.

Na *Avaliação da Estabilidade Preliminar e Acelerada*, as formulações testadas foram consideradas normal, ou seja, sem modificações. No final (t90) da *Avaliação da Estabilidade Normal* houve grande variação do valor do pH para todas as temperaturas de armazenamento, considerando o limite de 10%. As condições de armazenamento sugeridas para **BF+AF** são: ambiente e geladeira.

Na *Avaliação da Estabilidade Normal (AEN)*, a adição dos antioxidantes em **BF** reduziu o valor de pH. Na avaliação do FPS *in vitro* das formulações não submetidas à radiação, em todas as condições do estudo, a adição de **RES** praticamente manteve o valor de FPS quando comparado às formulações **BF+RES**, ao longo dos 90 dias. Além disso, a

adição dos antioxidantes não elevou o valor de FPS de forma expressiva e, também, não mateve o valor de FPS pós irradiação. O comprimento de onda crítico (λ_c) permaneceu acima de 370 nm, para todas as formulações, antes e após a irradiação no decorrer da AEN. Em relação ao parâmetro razão UVA/ UVB a adição de **AF** não favoreceu a proteção UVA nessas condições. O percentual de conservação de **BMBM** e **EHMC** por RMN quantitativo nas formulações fotoprotetoras com os antioxidantes em relação a base fotoprotetora foi mais elevado em todas condições ambientais (**A**, **G** e **E**) no decorrer da avaliação da estabilidade normal. Com destaque para a formulação **BF+RES** a qual apresentou o maior percentual de conservação, exceto na condição de estufa em relação a **BF+AF**. Pode-se concluir até o momento que **RES** e **AF** contribuíram na fotoestabilidade dos filtros estudados por diferentes mecanismos. O percentual de conservação dos filtros solares **BMBM** e **EHMC** por ^1H RMN foi maior com a adição de **RES** na base fotoprotetora no decorrer da AEN em todas as condições testadas. A atividade antioxidante da base fotoprotetora com **RES** obteve 97,0% de inibição de DPPH $^{\bullet}$, sendo maior que a **BF** adicionada de **AF** (91.0%), contudo a concentração de **RES** foi maior que do **AF**.

Após a irradiação, os sinais dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de todas as amostras aumentaram em amplitude e o menor sinal em relação à amostra de ecdise de pele de cobra (**EC**) foi da amostra **EC+BF+AF**. Destaca-se que os espectros com os antioxidantes **AF** e **RES** tiveram seus sinais atenuados. Aproximadamente 72 h após a irradiação, a amostra com ecdise de pele de cobra aumentou levemente sua amplitude em relação às demais.

A validação bioanalítica preliminar ao ensaio de penetração/ permeação cutânea foi considerada adequada de acordo com a legislação brasileira e internacional. As formulações testadas podem ser consideradas seguras em relação a baixa penetração/ permeação cutânea dos filtros solares **EHMC** e **BMBM** e seguras quanto a eficácia fotoprotetora. Destaca-se maior segurança de uso para a formulação **BF+AF**.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AAL, H. A.; MANSORI, M. E.; ZAHOUANI, H. A comparative study of frictional response of shed snakeskin and human skin. *WEAR*, v. 376-377, p. 281-294, 2017.
- ALBRECHT, S.; AHLBERG, S.; BECKERS, I.; KOCKOTT, D.; LADEMANN, J.; PAUL, V.; ZASTROW, L.; MEINKE, M.C. Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy. *Methods*, v. 109, p. 44-54, 2016.

- ALMEIDA, M. M. D.; BOU-CHACRA, N. A.; CASTRO LIMA, C. R. R. D.; ROSÁRIO, J. M. D.; FILHO, E. M.; MERCURI, L. P.; BABY, A. R.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Characterization and evaluation of free and nanostructured ursolic acid incorporated in cosmetic formulation using thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2401-2406, 2014.
- ALONSO, C.; MARTI, M.; BARBA, C.; CARRER, V.; RUBIO, L.; CODERCH, L. Skin permeation and antioxidant efficacy of topically applied resveratrol. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, p. 423-431, 2017.
- AMRI, A.; CHAUMEIL, J.C.; SFAR, S.; CHAURREAU, C. Administration of resveratrol: what formulations solution to bioavailability limitations. **Journal of Controlled Release**, v.158, n. 2, p. 182-193, 2012.
- ARAÚJO, G. L. B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. S. Paulo, 2009. 202p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- AUROUX, A. The Differential Scanning Calorimetry Technique. **Calorimetry and Thermal Methods in Catalysis**, France: Springer Science & Business Media, 2013. 65p.
- BABY, A.R.; MACIEL, C. P. M. ; ZAGUE, V. ; KANEKO, T. M. ; CONSIGLIERI, V. O. ; VELASCO, M. V. R. . Estabilidade de Produtos de Aplicação Tópica: ensaios aplicados aos produtos cosméticos e dermatológicos emulsionados. **International Journal of Pharmaceutical Compounding Edição Brasileira**, São Paulo, v. 6, n.3, p. 130-138, 2004.
- BABY, A.R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. São Paulo, 2007. 170p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, Z.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.
- BALANC, B.; TRIFKOVIC, K.; DORCEVIC, V.; MARKOVIC, S.; PJANOVIC, R.; NEDOVIC, V.; BUGARSKI, B. Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 832-842, 2016.

- BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor.** S. Paulo, 2011. 244p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; GAMA, R. M.; PINTO, C. A. S. O.; BEDIN, V.; VILLA, R. T.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Study of sunless tanning formulas using molted snakeskin as an alternative membrane model. **International Journal of Cosmetic Science**, v.33, n. 4, p. 359–365, 2010.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.
- BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 143–147, 2002.
- BARRESI, R.; CHEN, E.; LIAO, I.; LIU, X.; BAALBAKI, N.; LYNCH, S.; BRIEVA, P.; WANG, M.; ZHENG, Q.; BOUEZ, C. Alteration to the Skin Barrier Integrity Following Broad-spectrum UV Exposure in an *Ex vivo* Issue Model. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 23-28, 2021.
- BATISTA, I.A.S.A.; GONÇALVES, M.I.A.; SINGH, A.K.; HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of dimethylaminoethanol in cosmetic formulations by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 6, p. 1303-1308, 2008.
- BAUMANN, L. Basic Concepts of Skin Science. **Cosmetic Dermatology: Principles and Practice**, USA: McGraw-Hill Companies, p. 3, 5 e 6, 2002.
- BEZERRA, G. S. N.; PEREIRA, M. A. V.; OSTROSKY, E. A.; BARBOSA, E. G.; MOURA, M. F. V.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, p. 1683–1691, 2017.
- BONDA, C. Research pathways to photostables sunscreens. **Cosmetics & Toiletries**, v. 123, n. 2, p. 149-260, 2008.
- BONDA, C. Sunscreen photostability 101. **Happy**, v.46, n.72, p.1-4, 2009.

- BOOTS THE CHEMISTS LTD. The revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA: UVB Ratios. **According to the Boots Star Rating System**, Nottingham: The Boots Co. PLC, UK, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; BONDET, V.; BERSSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.
- BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**: 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004. 47p.
- BRASIL. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2008. 120p. (Séries Temáticas: Qualidade, 1).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2003.
- BRASIL. **RDC N° 69, de 23 de março de 2016**. Disponível em:
http://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2016/iels.mar.16/Iels55/U_RS-MS-ANVISA-RDC-69_230316.pdf. Acesso em: 30 de maio de 2018.
- BRASIL. **RDC N° 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em:
https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.
- BREZOVA, V.; GABCOVÁ, S.; DVORANOVA, D.; STASKO, A. Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.79, p. 121–134, 2005.
- BROWN, M. E.; GALLAGHER, P. K. Introduction to recent advances, techniques and applications of thermal analysis and calorimetry. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 5. Estados Unidos da America: Elsevier Science, p. 7, 2011.
- BURLAKA, A.; VOVK, A.; BURLAKA, A.; GAFUROV, M.; ISKHAKOVA, K.; GANUSEVICH, I.; VIRKO, S.; LUKIN, S. Redox Status of a Metastatic Microenvironment in the Liver of Patients with Colorectal Cancer from EPR. **Applied Magnetic Resonance**, v. 50, p. 391-402, 2019.
- CANDIDO, T. M.; OLIVEIRA, C. A.; ARIEDE, C. A.; VELASCO, M. V.; ROSADO, C.; BABY, A.R. Safety and Antioxidant Efficacy Profiles of Rutin-Loaded Ethosomes for

- Topical Application. **An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 19, p. 1773–1780, 2018.
- CANTO, E. L. **O que é coeficiente de partição?** 2016. Disponível em: <http://www.professorcanto.com.br/boletins_qui/055.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- COLIPA. *In vitro* UV Photoprotection Method Task Force, “**Method for *in vitro* determination of UVA protection, 2011**”, available at the COLIPA website, 2011.
- CERESOLE, R.; HAN, Y.K.; ROSASCO, M.A.; ORELLI, L.R.; SEGALL, A. Drug-excipient compability studies in binary mixtures of avobenzone. **Journal of Cosmetic Science**, v. 64, n.5, p.317-328, 2013.
- CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and *Ethylhexyl methoxycinnamate* by *Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine* (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 3, p. 401-406, 2001.
- CHATELAIN, E.; GABARD, B.; SURBER, C.
- CHAUDHURI, R. K.; LASCU, Z.; PUC CETTI, G.; DESHPANDE, A.A; PAKNIKAR, S.K. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n.3, p. 823–828, 2006.
- COLEMAN, N. J.; CRAIG, D. Q. M. Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, p. 13-29, 1996.
- DAMASCENO, S. S. **Evaluation of the antioxidant activity of caffeic and ferulic acids in controlling the stability of soybean biodiesel**. João Pessoa, 2011. 96p. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Universidade Federal da Paraíba.
- DANELUTI, A. L. M.; NETO, F. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R.; MATOS, J. R. Evaluation and characterization of the encapsulation/entrapping process of octyl methoxycinnamate in ordered mesoporous silica type SBA-15. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, p. 789-798, 2018.
- DARIO, M. F.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Effects of solar radiation on hair and photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 240-246, 2015.
- DARIO, M. F.; PAHL, R.; CASTRO, J. R.; LIMA, F. S. L.; KANEKO, T. M.; PINTO, C. A. S. O.; Baby, A. R.; Velasco, M. V. R. Efficacy of *Punica granatum* L. hydroalcoholic

- extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 142-147, 2013.
- DARVIN, M. E.; HAAG, S.; MEINKE, M.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Radical Production by Infrared A Irradiation in Human Tissue. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, p. 40–46, 2010.
- DEKIĆ, S.; VLJEVIĆ, S. M.; VAJS, V.; JOVIĆ, S.; PETROVIĆ, A.; NIKIĆEVIĆ, N.; MANOJLOVIĆ, V.; NEDOVIĆ, V.; TEŠEVIĆ, V. *Trans* and *cis* resveratrol concentration in wines produced in Serbia. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.73, n. 11, p. 1027–1037, 2008.
- DELMAS, D.; AIRES, V.; LIMAGNE, E.; DUTARTRE, P., MAZU', F.; GHIRINGHELLI, F.; LATRUFFE, N. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 48–59, 2011.
- DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supra-molecular Structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913-921, 2012.
- DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 6, p. 1024-1035, 2000.
- DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 9, p. 835-843, 2006.
- DRAELOS, Z. D. Cosmetic Dermatology Products and Procedures. **Percutaneous delivery of cosmetic actives to the skin**, USA: Wiley Blackwell, p. 63, 2010.
- EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA. **Method for in vitro determination of UVA protection, Guideline 2011**. Disponível em: <http://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=33%3Amethod-for-in-vitro-determination-of-uva-protection-2011&catid=46%3Aguidelines>. Acesso em 22 fev. 2021.
- FAGRON. **Ficha Técnica resveratrol**. Disponível em: <https://br.fagron.com/pt-br/nossos-produtos-r>. Acesso em: 13.06.2019.
- FDA. Food and Drug Administration. **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry**. 2018.

- FIGUEIRAS, T. S.; NEVES-PETERSON, M. T.; PETERSEN, S. B. Activation Energy of Light Induced Isomerization of Resveratrol. **Journal of Fluorescence**, v. 21, p. 1897-1906, 2011.
- FREIRE, T. B.; DARIO, F. M.; MENDES, O. G.; OLIVEIRA, A. C.; NETO, A. V.; FARIA, D. L. A.; SILVA, V. R. L.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: characterization and in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1-11, 2019.
- FREITAS, J. V. **Avaliação da fotoestabilidade e penetração cutânea de fotoprotetores contendo associações de filtros solares, trans-resveratrol e betacaroteno**. Ribeirão Preto, 2013. 187p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
- FREITAS, J. V.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; GASPAR, L. R. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 484, p. 131-137, 2015.
- FISCHER, H.; GOTTSCHLICH, R.; SEELIG, A. Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, 201–211, 1998.
- GADAPE, H. H.; PARIKH, K. S. Quantitative determination and validation of pioglitazone in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.1, p.649-664, 2011.
- GARCIA, M. C. **Photoprotection/ Photostabilizer potencial in a quercetin sunscreen: determination of physical-chemical, safety and efficacy properties**. S. Paulo, 2019. 136f. Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- GÓMEZ, J. A.; KINOSHITA, A.; CHEN, F.; GUIDELLI, E. J.; RECH, A. B.; ALVES, G., BAFFA, O. Electron magnetic resonance dosimetry. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 5, p. 221-32, 2011.
- GULÇIN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 210-218, 2010.
- HAIGH, J. M.; BEYSSAC, E.; AIACHE, J. M. Can shed snakeskin be considered to be a 'model' membrane for human stratum corneum? **Proc. 2nd World Meeting APGI/APV**, p. 1041-1042, 1998.

- HALLSTAR INNOVATIONS CORP. **Test method for determining compounds capable of quenching electronic singlet state excitation of photoactive compounds.** Depositante: Craig Bonda. 7776614B2. Depósito: 08 nov. 2007. Concessão: 17 ago. 2010.
- HANSON RESEARCH. **Figura da célula de Franz Hanson.** Disponível em: <https://hansonresearch.com/news/page/5/>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- HARADA, K.; MURAKAMI, T.; KAWASAKI, E.; HIGASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; YATA, N. *In vitro* Permeability to Salicylic Acid of Human, Rodent, and Shed Snakeskin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 414-418, 1993.
- HAYDEN, C. G. J.; CROSS, S. E.; ANDERSON, C.; SAUNDERS, N.A.; ROBERTS, M.S. Sunscreen Penetration of Human Skin and Related Keratinocyte Toxicity after Topical Application. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 18, p. 170–174, 2005.
- HERRLING, T.; FUCHS, J.; REHBERG, J.; GROTH, N. UV-Induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 59–67, 2003.
- HOLLIS, D. P. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 1682-1684, 1963.
- HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. Quantitative NMR spectroscopy — applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, n.5, p.806-812, 2005.
- HUBNER, A.; SOBREIRA, F.; NETO, A. V.; PINTO, C. A. S. O.; DARIO, M. F.; DÍAZ, I. E. C.; LOURENÇO, R. F.; ROSADO, C.; BABY, A. R.; BACCI, E. M. The Synergistic Behavior of Antioxidant Phenolic Compounds Obtained from Winemaking Waste's Valorization, Increased the Efficacy of a Sunscreen System. **Antioxidants**, n. 8, v. 530, p. 1-16, 2019.
- HUNG, C.; LIN, Y.; HUANG, Z.; FANG, J. Delivery of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, from Solutions and Hydrogels via the Skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 955-962, 2008.
- ICH. International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. 2005, 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso: 10 abr. 2010.

- INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de pele melanoma 2020**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 02 ago. 2021.
- ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, H. Use of Shed Snakeskin as a Model Membrane for *in Vitro* Percutaneous Penetration Studies: Comparison with Human Skin. **Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1042–1047, 1990.
- JIA, Z.; ZHU, H.; MISRA, B. R.; MAHANEY, J. E.; LI, Y.; MISRA, H. P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 313, p. 187–194, 2008.
- 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**, v. 272, n. 1, p. 45-55, 2004.
- JUNGNICKEL, J.L.; FORBES, J.W. Quantitative measurement of hydrogen types by intergrated nuclear magnetic resonance intensities. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 938-942, 1963.
- KANSKI, J.; DRAKE, J.; AKSENOVA, M.; ENGMAN, L.; BUTTERFIELD, D. A. A Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(*N, N*-dimethylamino) benzenetellurenyl] propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. **Brain Research**, v. 911, p. 12-21, 2001.
- KAWAKAMI, C. M.; GASPAR, L. R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 239-247, 2015.
- KAWAKAMI, C. M.; MÁXIMO, L. N. C.; FONTANEZI, B. B.; SILVA, R. S.; GASPAR, R. R. Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB) as additive to the UV filter avobenzone in cosmetic sunscreen formulations-Evaluation of the photochemical behavior and photostabilizing effect. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 299-309, 2017.
- KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2161–2168, 2002.
- KLIMOVA, Z.; HOJEROV, J.; BERANKOV, M. Skin absorption and human exposure estimation of three widely discussed UV filters in sunscreens e *In vitro* study mimicking real-life consumer habits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 237-250, 2015.

- KOCKLER, N. I.; OELGEMOLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 13, p. 91-110, 2012.
- KOUCHAK, M.; HANDALI, S. Effects of Various Penetration Enhancers on Penetration of Aminophylline Through Shed SnakeSkin. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, n.1, 24-29, 2014.
- KRISHNAN, R.; NORDLUND, T. M. Fluorescence Dynamics of Three UV-B Sunscreens. **Journal of Fluorescence**, v. 18, p. 203–217, 2008.
- KURAMOTO, M.; TANAKA, T.; MAKITA, H.; NAKAMURA, Y.; YATA, N. Characteristics of Shed Snake Skin Permeability to Indomethacin and Fatty Alcohols. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 682-684, 1996.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. India: Sarat Books, 2006. p. 944.
- LANGE, M. H.; HERBELÉ, G.; MILAO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.
- LIU, Y.; CHEN, G.; CHENA, Y.; LIN, J. Inclusion complexes of azadirachtin with native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4037–4042, 2005.
- LOHAN, S. B.; LAUER, A. C.; ARNDT, S.; FRIEDRICH, A.; TSCHERCH, K.; HAAG, S. F.; DARVIN, M. E.; VOLLERT, H.; KLEEMANN, A.; GERSONDE, I.; GROTH, N.; LADEMANN, J.; ROHN, S.; MEINKE, M. C. Determination of the Antioxidant Status of the Skin by In Vivo-Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. **Cosmetics**, v. 2, p. 286-301, 2015.
- LOPES, L.B.; VANDEWALL, H.; LI, H.T.; VENUGOPAL, V.; LI, H.K.; NAYDIN, S.; HOSMER, J.; LEVENDUSKY, M. Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1346-1357, 2010.
- LUND, L.; LEY, R. D.; FELTON, L. F.; TIMMINS, G. S. Determination of Wavelength-Specific UV Protection Factors of Sunscreens in Intact Skin by EPR Measurement of UV-Induced Reactive Melanin Radical. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, p. 952–957, 2007.
- MACHADO, K. C.; FREITAS, R. M. Ácido Ferúlico e Sistema Nervoso Central: uma prospecção tecnológica. **Geintec**, v. 3, n. 2, p. 221-226, 2013.

- MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 813-823, 2005.
- MALZ, F. Quantitative NMR in the solution state NMR. In: HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. **NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis**. Oxford: Elsevier, 2008. p.43-47.
- MARTINS, T. E. A.; PINTO, C. A. S. O.; OLIVEIRA, A. C.; VELASCO, M. V. R.; GUTIÉRREZ, A. R. G.; RAFAEL, M. F. C.; TARAZONA, J. P. H.; RETUERTO-FIGUERO, A. M. G. Contribution of Topical Antioxidants to Maintain Healthy Skin - A Review, **Scientia Pharmaceutica**, v. 88, n. 27, p. 1-17, 2020.
- MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3369-3373, 2010.
- MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e Avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol Resveratrol**. Ponta Grossa, 2011. 88p. Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- MIRANDA, M. A.; GALINDO, F.; AMAT, A. M.; ARQUES, A. Pyrylium salt-photosensitized degradation of phenoliccontaminants derived from cinnamic acid with solar lightCorrelation of the observed reactivities withfluorescence quenching. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 127–133, 2000.
- MITURI, G. J.; MARTINCIGH, B. S. Photostability of the sunscreensing agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal Photochemistry Photobiology A: Chemistry**, v. 200, p. 410-420, 2008.
- MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 263-269, 2009.
- MOROCHO-JÁCOME, A. L.; FREIRE, T. B.; OLIVEIRA, A. C.; ALMEIDA, T. S.; ROSADO, VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. *In vivo* SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 729-737, 2020.
- MOTA, A. C. V.; FREITAS, Z. M. F. F.; JÚNIOR, E. R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; OZZETTI, R. A.; VERGNANINI, A. L.; RIBEIRO, V. L.; SILVA, R. S.; SANTOS, E. P. *In vivo* and *in vitro* evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4689–4701, 2013.

- MOYAL, D. The development of efficient sunscreens. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v. 78, n. 7, p. 31-34, 2012.
- MURPHY, R. B.; STATON, J.; RAWAL, A.; DARWISH, T. A. The effect of deuteration on the keto-enol equilibrium and photostability of the sunscreen agent avobenzone. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1410-1422, 2020.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Figura da anatomia da pele**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>. Acesso: 12 ago. 2018.
- NGAWHIRUNPAT, T.; PANOMSUK, S.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T.; HATANAKA, T. Comparison of the percutaneous absorption of hydrophilic and lipophilic compounds in shed snakeskin and human skin. **Pharmazie**, v. 61, n. 4, p. 331-334, 2006.
- OLIVEIRA, A. C. de. Ácido ascórbico associado ao ácido cafeico em formulações tópicas: avaliação da ação antioxidante e peroxidação lipídica. 2021. 147f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, R. V. M.; OHARA, M. T.; VILA, M. M. D. C.; GONÇALVES, M. M. G. *In vitro* evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 363-370, 2010.
- OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Formulações Farmacêuticas na Indústria Farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- OGUCHI-FUJIYAMA, N.; MIYAZAWA, K.; KIKUCHIB, A.; YAGI, M. Photophysical properties of dioctyl 4-methoxybenzylidenemalonate: UV-B absorber. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 10, p. 1528-1535, 2012.
- PAEPE K. D.; ROSEEUW, D.; ROGIERS, V. Repair of acetone- and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, n. 6, p. 587-594, 2002.
- PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos**. 2008. 185p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M. A. A blocked diketo form of avobenzone: photostability, photosensitizing properties and triplet

- quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.
- PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, n. 3, p. 153-160, 2001.
- PERNIN, A.; BOSCH, V.; MAILLARD, M.; DUBOIS-BRISSENET, F. Ferulic Acid and Eugenol Have Different Abilities to Maintain Their Inhibitory Activity Against *Listeria monocytogenes* in Emulsified Systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-10, 2019.
- PERES, D. D. **Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo**. São Paulo. 2015. 168p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- PERES, D. A.; SARRUF, F. D.; OLIVEIRA, C. A. D.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology**, v. 185, p. 46–49, 2018.
- PERETTI, S. C.; MOREIRA, M. A. L.; BARRETO, G. R.; MORAES, C. A. P. Resveratrol para cosméticos no clareamento da pele. **Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 10, n. 1, p. 3-16, 2015.
- PESCIA, A. C.; ASTOLFI, P.; PUGLIA, C.; BONINA, F.; PERROTTA, R.; HERZOG, B.; DAMIANI, E. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is best? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 217-223, 2012.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p.45-61, 2002.
- PINTO, C. A. S. O. **Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. 2014. 212f. Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- POLONINI, H. C.; LIMA, L. L.; GONÇALVES, K. M.; CARMO, A. M. R.; SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 964-968, 2013.
- PONGJANYAKUL, T.; PRAKONGPAN, S.; PANOMSUK, S.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; PRIPREM, A. Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1345-50, 2002.

- POPOV, A. P.; S. HAAG.; M. MEINKE; LADEMANN J.; PRIEZZHEV A. V, MYLLYLÄ R. Effect of size of TiO₂ nanoparticles applied onto glass slide and porcine skin on generation of free radicals under ultraviolet irradiation. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, p. 0210111-0210117, 2009.
- PRAÇA, F. G.; MEDINA, W. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Avaliação de cobra brasileira (*Crotalus durissus terrificus*) como modelo substituto de membrana biológica de ensaios *in vitro* de permeação cutânea de drogas. **CuidArt Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 22-130, 2015.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. 71p.
- PUBCHEM. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Ferulic Acid**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>. Acesso: 10 de novembro de 2019a.
- PUBCHEM. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Resveratrol**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol#section=Octanol-Water-Partition-Coefficient>. Acesso:10 de novembro de 2019b.
- RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. **Pharmacology**. 6. ed. Churchill: Livingstone, 2007, 844p. 844.
- RIBEIRO, U. L. A ascensão do consumo ético de produtos vegetarianos e veganos no mercado brasileiro. **Observatorio de La Economia Latinoamericana**, p. 1-12, 2019.
- RIGGY, P. C.; BARRY, B.W. Shed snakeskin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, p. 235-40, 1990.
- REIS, J. R.; CORRÊA, M. A.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Synthesis, antioxidant and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin cancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 2733-2738, 2014.
- RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RINNERHALER, M.; BISCHOF, J.; STREUBEL, M. K.; TROST, A.; RICHTER, K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. **Biomolecules**, v. 5, 545-589, 2015.
- RODRIGUÉZ, R. A.; LAHOZ, I. R.; FAZA, O. N.; CID, M. M.; LOPEZ, C. S. Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 9175-9182, 2012.

- ROJAS, J.; LONDOÑO, C.; CIRO, Y. The health benefits of natural skin UVA photoprotective compounds found in botanical sources. **International of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 13–23, 2016.
- RUELA, A.L M.; PERISSINATO, A.G.; LINO, M.E.S.; MUDRIK, P.S.; PEREIRA, G.R. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 527-544, 2016.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 279-276, 1998.
- SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetina on the UV filter combination, *Butyl Methoxydibenzoylmethane* and *Octylmethoxycinnamate*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 2, p. 273-278, 2010.
- SCCNFP/0119/99, 1999. **Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products**. Plenary Session of 23 June 1999.
- SCCS/1628/21, 2021. **The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 11th revision**, Plenary meeting on 30-31 March 2021.
- SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507-515, 2011.
- SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 51-56, 2001.
- SHAKEEL, F.; MOUNIR, M. S.; HAQ, N.; SIDDIQUI, N. A. Solubility and thermodynamics of ferulic acid in different neat solvents: Measurement, correlation and molecular interactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 236, p. 144-150, 2017.
- SILVA, S. A. M.; MICHNIAK-KOHN, B.; LEONARDI, G.R. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An Bras Dermatol*, 92, 367-74, 2017a.
- SILVA, R. C.; TEIXEIRA, J. A.; NUNES, W. D. G.; ZANGARO, G. A. C.; PIVATTO, M.; CAIRES, F. J.; IONASHIRO, M. Resveratrol: a thermoanalytical study. **Food Chemistry**, v. 237, p. 561-565, 2017b.
- SIMPSON, A. J.; MCNALLY, D. J.; SIMPSON, M. J.; NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 58, p. 97–175, 2011.

- SKIN CANCER FOUNDATION. **Skin Cancer Facts & Statistics**. Available in: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts/>. Access in: 02 aug. 2021.
- SOUSA, R. R. **Caracterização e avaliação da fotoestabilidade do filtro solar *Butyl Methoxy dibenzoylmethano* (avobenzona) através de IV e RMN**. 2015. 70f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Química - Universidade Federal de Goiás.
- 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, n. 2, p. 155-164, 1999.
- TAKAHASHI, K.; SAKANO, H.; RYTTING, J. H.; NUMATA, N.; KURODA, S.; MIZUNO, N. Influence of pH on the Permeability of p-Toluidine and Aminopyrine Through Shed SnakeSkin as a Model Membrane. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, p. 159–164, 2001.
- TAKAOKA, M. S.; BABY, A. R.; PRESTES, O. S.; PINTO, C. A. S. O.; SILVA, V. R. L.; VELASCO, M. V. R.; KAWANO, Y.; KANEKO, T. M. Avaliação da interação de compostos ativos hidratantes com modelo de biomembrana de *Crotalus durissus* por meio de calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia RAMAN. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 53-58, 2010.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 669-675, 2006.
- TREBSE, P.; OLYAKOVA, O. V.; BARANOVA, M.; KRALJ, M. B.; DOLENC, D.; SARAKHA, M.; KUTIN, A.; LEBEDEV, A. T. Transformation of avobenzene in conditions of aquatic chlorination and UV-irradiation. **Water Research**, v. 101, p. 95-102, 2016.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Pharmacopeial Forum 2009**. Disponível em: < http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/transdermalStimArticle.pdf >. Acesso em: 06 de jun. de 2016.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. **USP 38; the National Formulary: NF 33: official** from May 1, 2015/ by authority of the United States Pharmacopeial Convention; prepared by the Council of Experts and its Expert Committees, 2.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 36; The National Formulary: NF31. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 983-988, 2013.

- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. International Conference on Harmonisation: guidelines for the photostability testing of new drug substances and products; availability. **Federal Register**, v.62, n.62, p.27115-27122, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM129106.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2009. Acesso em: 05 fev. 2011.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. **The United States Pharmacopeia: The Official Compendia of Standards**. 31. MD: Rockville, MD: Asian Edition, v. 2, p. 1590, 2008.
- 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 rutina 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, 2008.
- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.
- VICENTINE, F. T. M. C.; GEORGERTTI, S. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Assesment of *in vitro* methodologies to determine topical and transdermal delivery of the flavonoid quercetin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, 2009.
- ZANGGER, K. Pure shift NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 86-87, p. 1-20, 2015.
- ZHOU Z, L. I. W.; SUN, W.; LU, T.; TONG, H. H. Y.; SUN, C. C.; ZHENG, Y. Resveratrol Cocrystals with Enhanced Solubility and Tabletability. **International Journal of Pharmceutics**, v. 509, p. 391-399, 2016.
- ZUPANČIČ, S.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 196-204, 2015.
- YADAV, D. K.; KUMAR, S.; CHOI, E. H.; CHAUDHARY, S.; KIM, M. H. Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. **Nature**, v. 9, p. 1-10, 2010.
- WELLS, R. J.; HOOK, J. M.; AL-DEEN, T. S.; HIBBERT, D. B. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) spectroscopy for assesing the purity of technical grade agrochemicals: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and sodium 2,2-dichloropropionate

(Dalapon sodium). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3366-3374, 2002.

WHO. World Healthy Organization. Radiation: **Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer**.

Available in: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer). Access in: 02 aug. 2021.

WIDLER, N.; SIGRIST, A.; GAFNER, F. M. Lipid analysis and transepidermal water loss in snakes. **IFSCC Magazine**, v. 5, p. 24-29, 2002.

ANEXO I: Ciência CEUA/FCF orelha de porco

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 64.2017-P553

São Paulo, 13 de novembro de 2017.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 10 de novembro de 2017, **tomou ciência** do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo de fotoestabilização por flavonoides dos filtros avobenzona e p-metoxicinamato de octila" (Protocolo CEUA nº 553).

Tendo em vista que a procedência do material biológico será decorrente de abate frigorífico, conduzido sem a interferência do pesquisador responsável e da instituição, a CEUA entendeu que o projeto não requer sua análise ética, deliberando apenas por **registrar e arquivar**.

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).

Thamires Batello FreireOrientador(a)/supervisor(a): Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco
FBF/FCF/USP

ANEXO II: Ciência CEUA/FCF ecclise de pele de cobra

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Ofício CEUA/FCF 034.2020

CIÊNCIA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacéuticas da Universidade de São Paulo, em reunião realizada no dia 06/03/2020, tomou ciência da doação de 2 mudas de *Crotalus durissus* pelo Instituto Butantan ao Projeto de Pesquisa intitulado "Influência de antioxidantes na fotostabilização da avobenzone (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores." (CEUA 612), da pesquisadora Thamires Batello Freire

São Paulo, 24 de junho de 2020.


Profa. Dra. Neuzi Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Realizações no período (congressos e artigos)

1. Evento Internacional

a) Pôster e resumo de trabalho científico apresentado no 28th EADV Congress 2019, de 09 a 13 de outubro de 2019, IFEMA, Feria de Madri, Espanha.

Antioxidants as photostabilizer of the UVA/UVB filters widely employed in cosmetics



M. Valéria R. Velasco, Thamires B. Freire, M. Inês de A. Gonçalves, Andressa C. de Oliveira, Nadia Rusink, André R. Baby, Claudineia A. S. O. Pinto
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil/ mvrobles@usp.br

INTRODUCTION

Resveratrol is a phenolic compound and it has antioxidant properties. The addition of natural substances, as the group of flavonoids that present positive results in relation to the photoprotective efficacy, and the resveratrol is a good example is interesting for photoprotective formulations. The photoinstability of *butyl methoxydibenzoylmethane*/ avobenzene BMBM/ UVA filter) is biologically relevant and it has been evidenced by DNA damage, cytotoxicity of human keratinocytes and lipid peroxidation. One the most strategy to reduce the instability of chemical UV filters after the exposition of UV radiation is based on the addition of photostabilizer agents. The objective of this research was to evaluate the potential of resveratrol as a photostabilizer of the UVA filter BMBM by decreasing fluorescence emission.

MATERIALS & METHODS

The qualitative analysis of the suppression of the singlet energy state of BMBM was performed by observing the fluorescence presented by the filter (BMBM) solution in methanol plus resveratrol. *Phenylethyl benzoate* was the negative control. The solutions (10µl) were transferred to a silica gel coated thin layer chromatography sheet. The reading was under a source of 365nm. The response was positive when the samples had fluorescence intensity decreasing with respect to each other and smaller than the negative control.

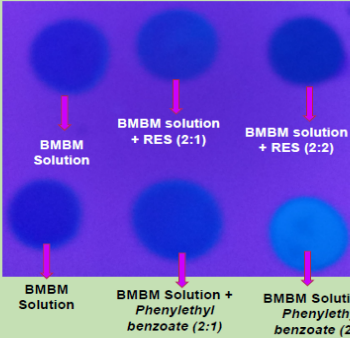
RESULTS

Resveratrol had the ability to suppress the singlet energy state of BMBM due the fluorescence intensity decreasing specially in the proportion of 2:2 concentration of the resveratrol to BMBM, perceived by the darkening of the circle (Figure 1). We can infer that one of the action mechanism of the photostabilization involved the transfer of singlet-singlet energy.

CONCLUSIONS

The addition of resveratrol in a solution with BMBM/ avobenzene, both in the same proportion (2:2), favored its photostability, probably by the transfer of singlet-singlet energy. The addition of this combination in formulation probably will guarantee the photoprotective efficacy. This work presents future perspectives for the development of broad spectrum photoprotective formulations with natural ingredients.


Figure 1- Suppression the singlet energy state of *butyl methoxydibenzoylmethane* (BMBM)



Legend: BMBM = avobenzene/ RES= resveratrol

REFERENCES

BREZOVA, V.; GABCOVÁ, S.; DVORANOVA, D.; STASKO, A. Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 79, p.121-134, 2005. / DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 5, n. 9, p. 835-843, 2006.



ACKNOWLEDGMENTS: Financing Support by CNPq and FAPESP



Abstract N°: P1500

Title: Antioxidants as photostabilizer of chemical filters in sunscreen products

M Valeria R Velasco¹, Thamires B Freire², M. Inês A. Gonçalves², Andressa C. Oliveira², André R. Baby², Claudinéia Ap. S. O. Pinto²

¹ Fund. Instituto De Pesquisas Farmacêuticas, São Paulo, Brazil, ² Faculty Of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, Brazil

Introduction

Resveratrol is a phenolic compound present in grape berry and it has antioxidant properties. The addition of natural substances in sunscreen formulations has been explored, especially the group of flavonoids that present positive results in relation to a photoprotective efficacy, and the resveratrol is a good example. It is believed that the photoinstability of *butyl methoxydibenzoylmethane/avobenzone* (BMBM/UVA filter) is biologically relevant and it has been evidenced by DNA damage, cytotoxicity of human keratinocytes and lipid peroxidation. The most frequently employed strategy to reduce the instability of chemical UV filters in sunscreen products after exposure to UV radiation is based on the addition of photostabilizer agents. The objective of this research was to evaluate the potential of resveratrol as a photostabilizer of the UVA filter BMBM by decreasing fluorescence emission.

Materials and methods

The qualitative analysis of the suppression of the singlet energy state of BMBM was performed by observing the fluorescence presented by the filter ((BMBM) solution in methanol and with the addition of resveratrol. *Phenylethyl benzoate* was used as a negative control. The solutions (10 µl) were transferred to a silica gel coated thin layer chromatography sheet. After evaporation of the solvent the reading was performed under a 365 nm source. The response was considered positive when the samples had fluorescence intensity decreasing with respect to each other and smaller than the negative control.

Results

Resveratrol had the ability to suppress the singlet energy state of BMBM due to fluorescence intensity decreasing specially with the proportion of 2:2 concentration of resveratrol and avobenzone. We can infer that one of the mechanisms involved in the photostabilization involved the transfer of singlet-singlet energy.

Discussion

The addition of resveratrol in a solution with the UVA chemical filter BMBM/avobenzone favored its photostability probably by the transfer of singlet-singlet energy in order to ensure the photoprotective efficacy. It is important to consider the other ingredients present in the photoprotective formulation. This work presents future perspectives for the development of broad spectrum photoprotective formulations with natural ingredients in sunscreen formulations.

2. Evento Nacional

a) Co-autoria em trabalho científico exposto em painel digital no evento científico nacional:
XX Congresso Farmacêutico de São Paulo 2019, em 10 de outubro de 2019, São Paulo.





ANTIOXIDANTES COMO FOTOESTABILIZADORES DE FILTROS UVA/UVB

USP

¹ LOHAYNE GRAZIELLE COSTA, ² THAMIRES BATELLO FREIRE, ³ LUCAS COELHO RIGHETTI, ⁴ ANDRESSA COSTA DE OLIVEIRA, ⁵ MARIA VALÉRIA ROBLES VELASCO

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo -- São Paulo/SP

XX Congresso Farmacêutico de São Paulo/ 2019

1. Introdução e Objetivo

O resveratrol é um composto fenólico presente na casca da uva e possui propriedades antioxidantes. A adição de substâncias de origem natural em formulações com filtros solares tem sido amplamente explorada, principalmente os flavonóides, que apresentam resultados positivos em relação à eficácia fotoprotetora. A combinação dos filtros avobenzona (UVA) e octil-metoxicinamato (UVB) (Figura 1), é comumente empregada em formulações do mercado, porém apresentam baixa absorção espectral após exposição à radiação UV. Na tentativa de sanar esta instabilidade, podem ser adicionados agentes fotoestabilizadores.

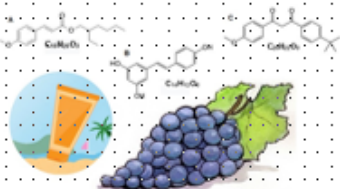


Figura 1 - Fórmula estrutural: (A) Octil-metoxicinamato; (B) Resveratrol; (C) Avobenzona (Adaptado de Sigma-Aldrich).

O emprego da técnica de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio permite quantificar os filtros solares após irradiações padronizadas, embora não seja comum para este fim. Este trabalho quantificou os filtros solares aditivados ou não de resveratrol no intuito de verificar sua fotoestabilidade (DÓNDI, ALBINI & SERPONE, 2006; LOHAN et al., 2015; MITURI & MARTINCIGH, 2008).

2. Material e Métodos

Foram preparadas soluções com o solvente DMSO-d₆ e os filtros avobenzona e octil-metoxicinamato na presença e ausência de resveratrol. As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e irradiadas a 760W/m² no simulador solar Suntest® CPS com filtro Daylight. Os espectros de ¹H-RMN foram obtidos na frequência de hidrogênio 300,13 MHz.

3. Resultados e Discussão

A análise quantitativa das alterações moleculares promovidas pelo UV (Tabela 1), verificou a preservação ou não dos filtros solares. A combinação destes com o resveratrol, após dose de irradiação de 13.211J cm⁻², mantém a forma trans do octil-metoxicinamato, notada por trans/cis de 30,65, enquanto que a solução dos filtros isolados foi 3,96. A fotoestabilidade dos filtros solares pode ser alterada dependendo da combinação de moléculas ativas na formulação, sendo que a mistura de octil-metoxicinamato com resveratrol foi benéfica, favorecendo a fotoestabilidade na formulação.

Tabela 1 - Alterações dos filtros BMBM e EHMC combinados ou não, em solução de DMSO-d₆, após exposição ao UV.

Soluções	Dose (J/cm²)							
	0h		4456 J cm ⁻² (2h)		8912 J cm ⁻² (4h)		13211 J cm ⁻² (6h)	
	trans/cis	abs/cis	trans/cis	abs/cis	trans/cis	abs/cis	trans/cis	abs/cis
BMBM-EHMC	3	3	11,76	22,24	6,54	15,79	3,96	9,31
BMBM-Res	-	10,37	-	4,93	-	6,61	-	9,31
EHMC-Res	10,45	-	6,37	-	2,85	-	2,20	4,74
BMBM-EHMC-Res	26,45	5,62	193,20	7,28	44,66	6,91	56,85	-

Leg.: BMBM: Butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzona); EHMC: Ethylhexyl methoxycinnamate (octil-metoxicinamato); RES: Resveratrol; (-): não calculado.

4. Conclusão

A adição de resveratrol em solução com octil-metoxicinamato preservou sua forma trans e favoreceu sua fotoestabilidade. Este trabalho apresenta perspectivas futuras no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras de amplo espectro com potencial para segurança de uso e eficácia fotoprotetora.

5. Referências


DÓNDI, A.; ALBINI, S.; SERPONE, S. Variations between different solar UVB filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protectors. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 3, n. 10, p. 1037-1040, 2004.
 LOHAN, S.; MITURI, M.; MARTINCIGH, G. The effect of UV radiation on the stability of octyl-methoxycinnamate in the presence of resveratrol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 5, n. 10, p. 1037-1040, 2015.
 MITURI, M.; MARTINCIGH, G. The effect of UV radiation on the stability of octyl-methoxycinnamate in the presence of resveratrol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 5, n. 10, p. 1037-1040, 2015.
 MITURI, M.; MARTINCIGH, G. The effect of UV radiation on the stability of octyl-methoxycinnamate in the presence of resveratrol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 5, n. 10, p. 1037-1040, 2015.

Financiamento: FAPESP, processo nº: 2018/11073-2 e CAPES código Financeiro 001.



b) Pôster e resumo de trabalho científico apresentado de forma remota no evento científico nacional: 32º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, em 06 de novembro de 2020, São Paulo.





Antioxidante (resveratrol) como fotoestabilizador de filtro UVA (avobenzona) amplamente empregado em cosméticos

Thamires Batello Freire^a, Claudineia Aparecida Sales de Oliveira Pinto^a, Andressa Costa de Oliveira^a, André Rolim Baby^a, Maria Valéria Robles Velasco^a
^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo, S. Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

O resveratrol (RES) é um composto fenólico presente nas cascas das uvas e é conhecido por suas propriedades antioxidantes. A adição de substâncias naturais em formulações fotoprotetoras tem sido explorada, principalmente o grupo dos flavonoides que apresenta resultados positivos em relação à eficácia fotoprotetora. Acredita-se que a fotoestabilidade do Butil Metoxidibenzolmetano (avobenzona/ BMBM), filtro UVA, é biologicamente relevante e foi evidenciada por danos no DNA, citotoxicidade dos queratinócitos humanos e peroxidação lipídica.

OBJETIVO

Avaliar a redução da instabilidade dos filtros solares, após a exposição à radiação UV sob influência da adição de ingredientes como o resveratrol (RES), que apresenta potencial fotoestabilizador da avobenzona, diminuindo a emissão de fluorescência, refletindo na eficácia fotoprotetora das formulações.

METODOLOGIA

A análise qualitativa da supressão do estado energético singlete da avobenzona foi realizada, observando a fluorescência da solução filtrante em metanol (2mg/mL⁻¹) e com a adição de resveratrol 2mg/mL⁻¹. O benzoato de feniletina foi usado como controle negativo. As soluções (10µL) foram transferidas para uma cromatofolha com indicador de fluorescência, revestida com sílica gel. Após evaporação do solvente, realizou-se a leitura, sob uma fonte de 385nm.

DISCUSSÃO E RESULTADOS

A resposta foi considerada positiva quando as amostras apresentaram intensidade de fluorescência diminuída uma em relação à outra e menor que o controle negativo (Figura 1). O resveratrol tem a capacidade de suprimir o estado de energia singlete da avobenzona devido à diminuição da intensidade da fluorescência, especialmente com o uso da concentração de 20mg/mL de resveratrol. A estrutura química dos filtros orgânicos favorece o deslocamento de elétrons quando são expostos à radiação UV, migram do estado fundamental para o excitado, estado singlete de energia. Quando o excesso de energia absorvida for totalmente dissipada, a molécula retorna ao estado fundamental, mas se a energia absorvida for parcialmente dissipada, passa do estado de energia singlete para o tripleto e só retornará ao estado fundamental, depois de dissipar o excesso de energia que pode estar na forma de fluorescência.

BIBLIOGRAFIA

BONDA, C. Sunscreen photostability 101. *Happi*, v.46, n.72, p.1-4, 2009./ CHAUDHURI, R.K.; LASCU, Z.; PUCCETTI, G.; DESHPANDE, A.A.; PAKNIKAR, S.K. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, n.3, p. 823-828, 2006./ DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 5, n. 9, p. 835-843, 2006./ LOHAN, S. B.; LAUER, A. C.; ARNDT, S.; FRIEDRICH, A.; TSCHERCH, K.; HAAG, S. F.; DARVIN, M. E.; VOLLERT, H.; KLEEMANN, A.; GERSONDE, I.; GROTH, N.; LADEMANN, J.; ROHN, S.; MEINKE, M. C. Determination of the Antioxidant Status of the Skin by *In Vivo*-Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Cosmetics*, v. 2, p. 286-301, 2015.



Legenda: Solução teste BMBM: (a) 2,0:0,0; Solução BMBM+RES: (b) 2,0:1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo BMBM e benzoato de feniletina: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0:1,0 e (f) 2,0:2,0.

Antioxidante (resveratrol) como fotoestabilizador de filtro UVA (avobenzona) amplamente empregado em cosméticos

Thamires Batello Freire^{1*}, Claudineia Aparecida Sales de Oliveira Pinto², Andressa Costa³, André Rolim Baby⁴, Maria Valéria Robles Velasco⁵

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo, S. Paulo, Brasil

*e-mail: tbfreire@usp.br

O resveratrol é um composto fenólico presente nas cascas das uvas e é conhecido por suas propriedades antioxidantes. A adição de substâncias naturais em formulações fotoprotetoras tem sido explorada, principalmente o grupo dos flavonoides que apresenta resultados positivos em relação à eficácia fotoprotetora. Acredita-se que a fotoinstabilidade do butil-metoxidibenzoilmetano (avobenzona), filtro UVA, é biologicamente relevante e foi evidenciada por danos no DNA, citotoxicidade dos queratinócitos humanos e peroxidação lipídica. A estratégia mais frequentemente empregada para reduzir a instabilidade dos filtros solares após a exposição à radiação UV está baseada na adição de agentes como o resveratrol que apresenta potencial fotoestabilizador da avobenzona, diminuindo a emissão de fluorescência, o que refletirá na eficácia fotoprotetora das formulações (objetivo deste trabalho). A análise qualitativa da supressão do estado energético singleto da avobenzona foi realizada observando a fluorescência da solução filtrante em metanol (2mg/mL^{-1}) e com a adição de resveratrol 2mg/mL^{-1} . O benzoato de feniletila foi usado como controle negativo. As soluções ($10\mu\text{L}$) foram transferidas para uma folha de cromatografia em camada fina revestida com sílica gel. Após evaporação do solvente, a leitura foi realizada sob uma fonte de 365nm . A resposta foi considerada positiva quando as amostras apresentaram intensidade de fluorescência diminuindo uma em relação à outra e menor que o controle negativo. O resveratrol tem a capacidade de suprimir o estado de energia singleto da avobenzona devido à diminuição da intensidade da fluorescência, especialmente com o uso da concentração de 20mg/mL de resveratrol¹. A estrutura química dos filtros orgânicos favorece o deslocamento de elétrons e quando forem expostos à radiação UV, esta é absorvida pela ativação dos elétrons do estado fundamental para o excitado, denominado de singleto de energia. Quando o excesso de energia absorvida for totalmente dissipada, a molécula retorna ao estado fundamental e se a energia absorvida for parcialmente dissipada, esta passa do estado singleto para o tripleto e, só retornará ao estado fundamental, depois de dissipar o excesso de energia, que pode estar na forma de fluorescência. Podemos inferir que um dos mecanismos relacionados na fotoestabilização envolve a transferência de energia singleto-singleto. A adição de resveratrol em solução com avobenzona favoreceu sua fotoestabilidade. Este trabalho apresenta perspectivas futuras para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras eficazes durante seu prazo de validade e garantindo a segurança de uso.

Palavras-chave: fotoprotetor, avobenzona, resveratrol, fluorescência, estado singleto

c) Co-autoria em trabalho científico exposto sob a forma de Pôster no evento científico nacional: 28º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, São Paulo 2020.



EVALUATE THE *IN VITRO* PHOTOPROTECTIVE EFFECTIVENESS OF FORMULATIONS WITH FERULIC ACID OR RESVERATROL

Lucas Coelho Righetti, Thamires Batello Freire, Claudinéia Ap. Sales de Oliveira Pinto, Maria Valéria R. Velasco

Faculty of Pharmaceutical Sciences/ University of São Paulo - SP

Lucasrighetti5@gmail.com

Objective

To evaluate the *in vitro* photoprotective efficacy of photoprotective formulations (SPF) associated or not with the antioxidants *Ferulic Acid* and *Resveratrol* during the Normal Stability Test (90 days) at room temperature (usual consumer), checking the influence of antioxidants on the maintenance of SPF, important and effective product against UVB radiation.

Methods and Procedures

Oil-in-Water (O/A) based emulsion were formulated with the sunscreen Butylmethoxydibenzoylmetano (BMBM) 5,0% w/w and Ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC) 10,0% w/w added or not with the antioxidants *Ferulic Acid* (FA) 1%w/w or *Resveratrol* (RES) 3%w/w. Formulations were subjected to the Normal Stability Test (90 days) at 20.0±2.0 °C (room temperature). *In vitro* SPF values, which are important for photoprotective efficacy were evaluated (ANVISA, 2004; VELASCO *et al.*, 2011).

Results

The SPF value *in vitro* decreased during the stability study at the condition of (20.0±2.0°C). Emphasis on the photoprotective formulation with RES that maintained its SPF value in relation to t₀ (101%). The base formulation with AF also obtained a satisfactory reduction of the value after 90 days (83%) (Figure 1). The base emulsion showed a greater reduction in SPF (49%), indicating that the addition of antioxidants FA and RES was favorable.

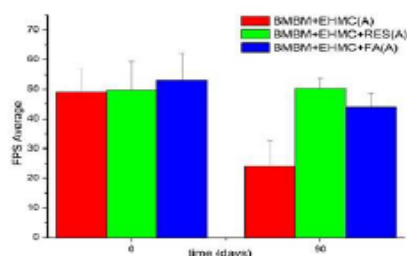


Figure 1. SPF of formulations in the Stability Test at room temperature.

Legend: BMBM: *Butyl Methoxydibenzoylmethane* 5,0%w/w; EHMC: *Ethylhexyl Methoxycinnamate* 10,0%w/w; FA: *Ferulic Acid* 1,0%w/w; RES: *Resveratrol* 3,0%w/w; t₀ = 48 h after preparation.

Conclusions

The addition of *Resveratrol* was the best combination in maintaining the estimated *in vitro* SPF value of the base emulsion with UVA and UVB sunscreens, during the Stability Test at room temperature.

References

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos: 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004. 47p.
- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) - revisão. *J. Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

d) Resumo aceito para ser apresentados na *XXIV Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia* da Universidade de São Paulo que se realizará de 27.09 a 1.10.2021, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.

New model of biological membrane (shed snakeskin) for antioxidant studies in photoprotective formulation

*Thamires Batello Freire (M), **Orlando R. Júnior (PD), *Claudinéia Aparecida S. de Oliveira Pinto (PD), ***Cassiano C. Escudeiro, *Andressa C. de Oliveira (M), *André R. Baby (PD), *M. Valéria Robles Velasco (PD)

*Faculty of Pharmaceutical Sciences (USP); **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN); ***Instituto de Pesquisa Clínica Integrada. São Paulo.

Introduction and Objectives: Antioxidants of natural origin are used in medicines and cosmetics with several benefits, such as: photoprotection, anti-aging and anti-pollutant. The human epidermis has important barrier and its anti-oxidative capacity is limited. Shed snakeskin (SS) is composed of the stratum corneum and provide a barrier like human skin. This study aim evaluated the use of SS seedlings as a alternative of human or animal skin *ex-vivo* by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) and The Forster Resonance Energy Transfer (FRET). **Material and Methods:** EPR, FRET and the percentual inhibition of the radical 2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl (DPPH•) were employed to evaluate the natural antioxidants (*Resveratrol*/ **RES** 3.0 w/w and *Ferulic acid*/ **FA** 1.0 w/w) associated with organic sunscreens (*Ethylhexyl Methoxycinnamate*/ **EHMC** 10.0%w/w and *Butyl Methoxydi-benzoylmethano*/ **BMBM** 5.0%w/w) in an emulsion (**PB**). **Results and Conclusions:** **RES** and **FA** can absorb the energy emitted by the **EHMC** in FRET, preventing the passage through the triplet state, favoring the photostability of this sunscreen, the same didn't occur with **BMBM**. The antioxidant activity with **RES** (97.0% inhibition of DPPH•) was higher than **PB + FA** (91.0%) in **PB**, however the concentration of **RES** was higher than **FA**. The sample **SS + PB + FA** had low number of free radicals after irradiation, and it was the better association of effective photoprotective formulation.

Financial support: FAPESP; CAPES

j) Trabalho científico aceito para apresentação oral no 7th Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences, 4-7 May 2020, Athens, Greece.

Em função da Pandemia pelo Covid e as normas da USP de não permitir viagens, o trabalho será apresentado em 2022.

Evaluation of natural antioxidants associated with UVA/UVB sunscreens using Thermal analysis (TG and DSC)

Autores: Maria Valéria Robles Velasco, Thamires Batello Freire, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Maria Inês de Almeida Gonçalves, Andressa Costa de Oliveira, Lucas Ferreira Borge, André Rolim Baby.

In order to promote broad spectrum protection, most sunscreen products combine two or more filters for UVA and UVB protection of skin. The association of avobenzone (BMBM/ Butyl *methoxydibenzoyl methane*), UVA filter and octyl methoxycinnamate (EHMC/ *Ethylhexyl Methoxycinnamate*), UVB filter, is widely used in manipulated and industrialized formulations with broad UV spectrum of action but the photoprotective efficacy maybe compromised and it is exposing the skin to the harmful effects of UV radiation such as erythema, edema and possible DNA damage. To reduce the instability of chemical filters combination, it is possible to add photostabilizing agents. In this context, the use of natural substances has been explored, as ferulic acid and resveratrol with promising response. Thus, studies are needed: to ensure the stability chemical of active ingredients, the UVA and UVB photoprotective efficacy and to development of formulations, increasing their photostability potential. Thermal analysis provides information about the physical-chemical and thermal behavior of the ingredients. This study aims to evaluate the thermal behavior of sunscreens associated with antioxidants (ferulic acid and resveratrol) using Thermogravimetry (TG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The results indicated that AF was degraded based on DSC profile as well as TG/DTG. The disappearance of AF peak in the mixture with BMBM can be explained by the solubilization of AF in BMBM. The absence of a peak must not be considered as a chemical interaction since the enthalpy value of the BMBM melt peak in the calorimetric profile of the mixture was approximately 43% of the isolated peak considering a 1:1 mixture. The mixtures of AF + BMBM and AF + EHMC anticipated the degradation of AF on TG/DTG profile. The disappearance of the resveratrol (RES) peak in the BMBM mixture can be explained by its solubilization because it melts and degrades. The decomposition range of the EHMC was maintained, probably because it was sublimated and did not solubilize the resveratrol. Based on the DSC and TG/DTG charts, there was not chemical interaction between the cosmetic ingredients. Stability can be affected and compromise the photoprotective efficacy.

Keywords: ferulic acid, resveratrol, avobenzone, octyl methoxycinnamate, thermal analysis



ATHENS INSTITUTE FOR EDUCATION AND RESEARCH

A World Association of Academics and Researchers

8 Valaoritou Str., Kolonaki, 10671 Athens, Greece.

Tel: 210-36.34.210 Fax: 210-36.34.209 Email: info@atiner.gr URL: www.atiner.gr



(ATINER)

(ATINER)

Athens, 28 January 2020

Maria Valeria Robles Velasco, Professor
 Thamires Batello Freire, PhD Student
 Claudineia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Professor
 Maria Ines Almeida Goncalves, Professor
 Andressa Costa de Oliveira, Master Student
 Lucas Ferreira Borge, Master Student
 Andre Rolim Baby, Master Student
 University of Sao Paulo
 Brazil

Our Ref: PHA2020/1391010

Dear Colleagues,

I would like to inform you that the selection academic committee has decided to invite you to speak at our **7th Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences, 4-7 May 2020, Athens, Greece** on the topic of:

**Evaluation of Natural Antioxidants Associated with UVA/UVB Sunscreens
 Using Thermal Analysis (TG and DSC)**

Please be prepared for an **oral presentation in English only** of 15-20 minutes including discussion. During your presentation you may use PowerPoint. More information can be found at the conference website <https://www.atiner.gr/pharmako>. Confirm your participation by completing and sending the registration form **before 24 February 2020** by fax, regular mail or email. The registration form can be downloaded from <https://www.atiner.gr/2020/REG-PHA.doc>.

For your convenience, a special conference rate has been arranged with a local hotel to be announced 1-2 weeks before the conference. Please complete the registration form for the nights you want accommodation for. Reservations should be made as soon as possible as the offer only stands as long as rooms are available. If you need more information on the accommodation please send us an email to atiner@atiner.gr. The conference's social program is available on <https://www.atiner.gr/social-program>. These are academic events which give the opportunity to our conference participants to further discuss the issues developed during the formal sessions and establish academic collaborations with other scholars from many different countries.

If you want your paper to be considered (peer reviewed) for publication and **only then**, please submit your manuscript by **6 April 2020** using our website <http://www.athensjournals.gr/paper-submission> following the paper guidelines stated there. For more information, please see point 3 of our abstract and paper publication policy on <http://www.atiner.gr/acceptance.htm>. Please **do not submit** your paper if you do not want it to be published by ATINER.

I look forward to meeting you in Athens.

Yours Sincerely,

Dr. Gregory T. Papanikos
 President



3. Publicações

a) Artigos em revistas científicas indexadas

Artigo disponível no link:

<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/issue/view/127>



Brazilian Journal of Development | 43214
ISSN: 2325-8761

New model of biological membrane (shed snakeskin) for studies of antioxidant activity in photoprotective formulation

Novo modelo de membrana biológica (ecdise de pele de cobra) para estudos de atividade antioxidante em formulação fotoprotetora

DOI:10.34117/bjdv7n4-674

Recebimento dos originais: 15/03/2021
Aceitação para publicação: 29/04/2021

Thamires Batello Freire
MS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, CEP 05508-900, Brazil
E-mail: tbfreire@usp.br

Orlando Rodrigues Júnior
PhD

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN, São Paulo, CEP 05508-000, Brazil
E-mail: rodrjr@usp.br

Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto
PhD

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, CEP 05508-900, Brazil
E-mail: clausal@usp.br

Cassiano Carlos Escudeiro
SPC

Instituto de Pesquisa Clínica Integrada – IPCLin, São Paulo, CEP 13201-013, Brasil
E-mail: cassiano@ipclin.com.br

André Rolim Baby
PhD

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, CEP 05508-900, Brazil
E-mail: andrerb@usp.br

Maria Valéria Robles Velasco
PhD

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, CEP 05508-900, Brazil
E-mail: mvrobles@usp.br

ABSTRACT

Antioxidants of natural origin are used in medicines and cosmetics with several benefits, such as: photoprotective action, anti-aging, moisturizing and anti-pollutant. The human


Abstract

Antioxidants of natural origin are used in medicines and cosmetics with several benefits, such as: photoprotective action, anti-aging, moisturizing and anti-pollutant. The human epidermis has an important barrier effect and limited anti-oxidative capacity, so studies with the epidermis is essential. Shed snakeskin (SS) is composed of the stratum corneum and provide a barrier like human stratum corneum. This alternative does not show a tendency to microbiological degradation and can be considered ecologically correct. This study intends to present, in an innovative way, the Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy (EPR) and The Forster Resonance Energy Transfer (FRET) were employed to evaluate the natural antioxidant substances (*Resveratrol*/ RES 3.0 w/w and *Ferulic acid*/ FA 1.0 w/w) associated with organic sunscreens ingredients (*Ethylhexyl Methoxycinnamate*/ EHMC 10.0%w/w and *Butyl Methoxydibenzoylmethano*/ BMBM 5.0%w/w in a photoprotective emulsion (PB). Furthermore, the use of SS seedlings as a possible alternative to the use of human or animal skin *ex-vivo*. RES and FA can absorb the energy emitted by the EHMC in FRET, preventing the passage through the triplet state, favoring the photostability of this sunscreen, the same not occurred with the BMBM. Antioxidant activity of the photoprotective formulations was evaluated *in vitro* by the percentual inhibition of the radical 2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl (DPPH•). The antioxidant activity with RES, 97.0% inhibition of DPPH• in the PB, was higher than PB + FA (91.0%), however the concentration of RES in PB was higher than FA. The sample SS + PB + FA was the one with the lowest number of free radicals after irradiation, which corroborated the high percentage of radical inhibition *in vitro* and it was the better association with the photoprotective formulation.

Artigo disponível no link:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-021-11111-8>

Evaluation of interaction between natural antioxidants and chemical sunscreens aiming the photoprotective efficacy

[Thamires Batello Freire](#) , [Cibele Rosana Ribeiro de Castro Lima](#), [Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto](#), [Lucas Ferreira Borge](#), [André Rolim Baby](#) & [Maria Valéria Robles Velasco](#)

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2021) | [Cite this article](#)

115 Accesses | [Metrics](#)

Abstract

To promote broad-spectrum protection, the most sunscreen products combine two or more filters for UVA and UVB. The photoprotective efficacy may be affected by the instability of the chemical combination and it is possible to use natural photo-stabilizing substances with antioxidant activity, adding value to the formulation. This study aims to evaluate the thermal behavior of the filters avobenzone (*BMBM/ Butyl Methoxydibenzoylmethane*) and octyl methoxycinnamate (*EHMC/Ethylhexyl Methoxycinnamate*) associated with the antioxidants *ferulic acid (FA)* and *resveratrol (RES)*. To this, Thermogravimetry (TG) and Differential

Abstract

To promote broad-spectrum protection, most sunscreen products combine two or more filters for UVA and UVB. The photoprotective efficacy may be affected by the instability of the chemical combination and it is possible to use natural photostabilizing substances with antioxidant activity, adding value to the formulation. This study aims to evaluate the thermal behavior of the filters avobenzene (*BMBM/ Butyl Methoxydibenzoylmethane*) and octyl methoxycinnamate (*EHMC/ Ethylhexyl Methoxycinnamate*) associated to the antioxidants *ferulic acid (FA)* and *resveratrol (RES)*. To this, Thermogravimetry (TG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), tools very important of the thermal analysis were used. The results showed that the mixture *BMBM* with *FA* had physical interaction confirmed by TG/DTG profile. In the mixture of the ingredients *BMBM* with *RES*, probably it had *BMBM* hydrophobic bonds between hydroxyl groups of the phenolic rings of resveratrol, indicated chemical interaction. The mixture *EHMC* with *FA* indicated chemical interaction. In the mixture *RES* with *EHMC*, *EHMC* solubilized *RES*, indicating physical interaction. In this mixture, *RES* probably would be bioavailable, that is facilitate its penetration and action on the skin. The results showed that by DSC and TG techniques, it is possible to predict the stability profile of ingredients and formulations which will reflect in its efficacy and safety as UV photoprotection.

Ficha do aluno

9139 - 9129080 / 3 - Thamires Batello Freire

Email: tbfreire@usp.br

Data de Nascimento: 01/09/1987

Cédula de Identidade: RG - 42.474.920-8 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2012

Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Doutorado

Programa: Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data de Matrícula: 05/02/2018

Início da Contagem de Prazo: 05/02/2018

Data Limite para o Depósito: 07/02/2022

Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valeria Robles Velasco - 05/02/2018 até o presente Email: mvrobles@usp.br

Proficiência em Línguas:

Inglês, Aprovado em 05/02/2018

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/03/2020



Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 05/02/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5830-1/1	Formulações Cosméticas e Dermatológicas: Aspectos Clínicos (1)	09/10/2017	12/11/2017	75	5	90	A	N	Concluída
PGF5205-3/10	Microscopia de Força Atômica e Tunelamento (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	05/03/2018	22/06/2018	150	0	-	-	N	Matrícula cancelada
EDM5100-3/2	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	06/03/2018	04/06/2018	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
PST5883-4/2	Preparação Pedagógica em Psicologia Social (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	12/03/2018	22/04/2018	30	2	90	A	N	Concluída
FBF5800-2/2	Patentes em Fármaco e Medicamentos	15/03/2018	16/05/2018	45	3	100	A	N	Concluída
BMF5876-1/5	Introdução à Segurança Química de Laboratório de Pesquisa (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/04/2018	04/06/2018	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5779-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	11/05/2018	13/07/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5956-1/1	Atualização e Revisão de Modelos de Pele	04/02/2019	10/02/2019	30	2	100	A	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Atividade do Programa	Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), com carga horária total de 120 horas-atividade, de Fevereiro à Junho de 2020, tendo desenvolvido atividades didáticas junto à disciplina FBF0354 - Cosmetologia Aplicada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (2)	01/02/2020	30/06/2020	-	1	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	25
Estágios:			
Total:	0	20	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a)

Observações:

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588/05, alterada pelas Portarias GR-4391/09 e GR-4601/09 - PAE e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 11/08/2021

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 23:08:13 horas do dia 29/09/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: 13R3-KN1R-7ZHW-ZD69

Código de controle válido até: 29/10/2021

Currículo Lattes



Thamiros Batello Freire

Bolsista de Fixação de Recursos Humanos do CNPq - Nível F

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0445380433814719>

ID Lattes: **0445380433814719**

Última atualização do currículo em 03/09/2021

Doutoranda em Cosmetologia, Mestre em Ciências pela Universidade de São Paulo e graduada em Farmácia pela Universidade São Judas Tadeu (2011). Experiência profissional adquirida nas áreas: Hospitalar, Manipulação, Controle de Qualidade Físico-químico e Microbiológico, Garantia da Qualidade, Pesquisa e Desenvolvimento, Licitações, Drogeria, Distribuidora de matérias-primas, medicamentos e materiais médico-hospitalares e docência em curso técnico e em nível superior. (Texto informado pelo autor)


Identificação

Nome	Thamiros Batello Freire
Nome em citações bibliográficas	FREIRE, T. B.;FREIRE, THAMIROS BATELLO;FREIRE, BATELLO THAMIROS;FREIRE, TB;BATELLO, THAMIROS FREIRE;BATELLO FREIRE, THAMIROS
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/0445380433814719

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913621
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2018	Doutorado em andamento em FÁRMACO e Medicamentos. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação do mecanismo de fotoestabilização por flavonoides dos filtros avobenzona e -metoxicinamato de octila, Orientador:  Maria Valéria Robles Velasco. Palavras-chave: fotoproteção.
2015 - 2017	Mestrado em FÁRMACOS e Medicamentos (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão com cafeína com ação na HDLG, Ano de Obtenção: 2017. Orientador:  Maria Valéria Robles Velasco. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2008 - 2011	

Graduação em Farmácia.
 Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.
 Título: A atividade antifúngica do óleo essencial de Rosmarinus officinalis frente à Candida albicans, utilizando como padrão o produto Malvona.
 Orientador: Humberto Valvassori.
 Bolsista do(a): Programa Universidade para Todos, PROUNI, Brasil.

Formação Complementar

2013 - 2015	Inglês. (Carga horária: 185h). Minds English School (SP), MINDS, Brasil.
2008 - 2010	Regime de Iniciação Científica. Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.
2009 - 2009	Treinamento Teórico-prático sobre Técnicas de Aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 8h). Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.

Atuação Profissional

Centro Universitário Senac, SENAC/SP, Brasil.

Vínculo institucional
2013 - 2013 Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Docente curso técnico, Carga horária: 8

Vital Especialidades Dermocosméticas LTDA, VITAL, Brasil.

Vínculo institucional
2009 - 2011 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Quality Medical Comércio e Distribuidora de Medicamentos LTDA, DISTR., Brasil.

Vínculo institucional
2013 - 2015 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutico Responsável, Carga horária: 40

BLISFARMA, BLISFARMA, Brasil.

Vínculo institucional
2011 - 2012 Vínculo: , Enquadramento Funcional: Assistente da Garantia da Qualidade, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

RaiaDrogasil, DROGARIA, Brasil.

Vínculo institucional
2012 - 2013 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutico Responsável, Carga horária: 44

Associação Paulista para o Desenvolvimento da Medicina - Hospital São Paulo, SPDM/HSP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2009

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Auxiliar de farmácia, Carga horária: 48
Conhecimento da rotina hospitalar, medicamentos e materiais hospitalares

Outras informações

Farmácia de Manipulação Ultrafórmulas, FM, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 44

Farmácia de Manipulação Buenos Ayres, FM, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 40

FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO MATÉRIA PRIMA, MATÉRIA PRIMA, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 44

Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial ? SP, Senac Registro, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - 2021

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Monitora educacional, Carga horária: 14

Faculdade Método de São Paulo, FAMESP, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - 2018

Vínculo: Contrato, Enquadramento Funcional: Docente, Carga horária: 8

Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.

Vínculo institucional

2019 - 2019

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Docente, Carga horária: 4

Projetos de pesquisa

2018 - Atual

Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (filtro UVB) em fotoprotetores

Descrição: Com o intuito de promover proteção de amplo espectro, na maioria dos protetores solares estão associados no mínimo dois filtros orgânicos (UVA e UVB). A combinação da avobenzona (BMBM), filtro UVA, e do p-metoxicinamato de octila (EHMC), filtro UVB, é conhecida e muito utilizada em formulações manipuladas e industrializadas, porém apresenta alteração na absorção espectral após exposição à radiação UV. A estratégia empregada com maior frequência para reduzir a instabilidade da combinação é baseada na adição de agentes fotoestabilizadores. A adição de substâncias naturais em formulações fotoprotetoras vem sendo explorada, especialmente o grupo dos flavonoides que apresentam resultados positivos em relação à eficácia fotoprotetora. O

objetivo principal desta pesquisa será avaliar o potencial dos antioxidantes como substâncias fotoestabilizadoras dos filtros EHMC e BMBM. Serão desenvolvidas formulações contendo os dois filtros associados ou não com o antioxidante com melhor performance diante dos resultados preliminares e de acordo com planejamento fatorial em três níveis. As formulações serão avaliadas quanto à eficácia fotoprotetora in vitro aplicadas em placas de PMMA e analisadas por espectrofotometria de refletância com esfera de integração antes e após a exposição à radiação UV. As interações moleculares dos filtros com os antioxidantes serão avaliadas por ¹H RMN, DSC, TG, análise qualitativa da supressão do estado energético singleto, avaliação da permeação cutânea in vitro (difusão em célula de Franz), EPR ex vivo e FRET. Este trabalho apresenta perspectivas futuras para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras de amplo espectro com potencialização da segurança e eficácia.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

2015 - 2017

Integrantes: Thamires Batello Freire - Integrante / maria valéria robles velasco - Coordenador.

Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão com cafeína com ação na HDLG com ação anticelulítica.

Descrição: Projeto de mestrado..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

2008 - 2010

Integrantes: Thamires Batello Freire - Integrante / maria valéria robles velasco - Coordenador.

Avaliação comparativa dos efeitos do Durateston (propionato de testosterona 30mg, fenilpropionato de testosterona 60mg, isocaproato de testosterona 60mg, caproato de testosterona 100mg) no miocárdio de ratos

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Thamires Batello Freire - Integrante / Francisco Benedito Kuchinski - Coordenador.

Áreas de atuação

- | | |
|----|--|
| 1. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Fotoproteção. |
| 2. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Nanotecnologia. |
| 3. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Cosmética. |
| 4. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmácia. |

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Italiano	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. ★ MOROCHOJÁCOME, ANA LUCÍA ; **FREIRE, THAMIRES BATELO** ; OLIVEIRA, ANDRESSA COSTA ; ALMEIDA, TÂNIA SANTOS ; ROSADO, CATARINA ; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES ; BABY, ANDRÉ ROLIM . In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds-A review. *Journal of Cosmetic Dermatology JCR*, v. 20, p. 729-737, 2021.
Citações: WEB OF SCIENCE® 3
2. ★ **FREIRE, THAMIRES BATELO**; JÚNIOR, ORLANDO RODRIGUES ; PINTO, CLAUDINEIA APARECIDA SALES DE OLIVEIRA ; ESCUDEIRO, CASSIANO CARLOS ; BABY, ANDRÉ ROLIM ; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES . New model of biological membrane (shed snakeskin) for studies of antioxidant activity in photoprotective formulation/ Novo modelo de membrana biológica (ecdise de pele de cobra) para estudos de atividade antioxidante em formulação fotoprotetora. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, p. 43214-43236, 2021.
3. FILETO, M. B. ; SANCHO, D. M. ; **FREIRE, T. B.** ; PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Princípios ativos e procedimentos na Alopecia Androgenética. *BWS Journal*, v. 4, p. 1-13, 2021.
4. LIMA, C. R. R. C. ; COUTO, R. A. A. F. ; **FREIRE, T. B.** ; GOSHIYAMA, A. M. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. ; CONSTANTINO, V. R. L. ; MATOS, J. R. . Heat-damaged evaluation of virgin hair.. *Journal of Cosmetic Dermatology JCR*, v. 00, p. 1-8, 2019.
5. ★ **FREIRE, T. B.**; DARIO, M. F.; MENDES, O. G.; OLIVEIRA, A. C.; VETORE NETO, A.; FARIA, D. L. A.; SILVA, V. R. L. E.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Nanoemulsion containing caffeine for cellulite treatment: characterization and in vitro evaluation. *BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE) JCR*, v. 55, p. 1-11, 2019.
Citações: WEB OF SCIENCE® 2
6. CAETANO, ALLAN FELIPPE RODRIGUES ; MORAES, ERICK HERZOG DE ; **FREIRE, THAMIRES BATELO** . Educação Capitalista: um produto rentável na sociedade contemporânea. *Revista Gestão & Políticas Públicas*, v. 9, p. 217-234, 2019.
7. LIMA, C. R. R. C. ; **FREIRE, T. B.** ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. ; MATOS, J. R. . Proteção térmica capilar. *COSMETICS & TOILETRIES (ED. PORTUGUES)*, v. 30, p. 54-59, 2018.
8. ★ DARIO, M. F. ; **FREIRE, T. B.** ; PINTO, C. S. O. ; PRADO, M. S. A. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Tryptophan and kynurenine determination in human hair by liquid chromatography. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES JCR*, v. 1065-1066, p. 59-62, 2017.
Citações: WEB OF SCIENCE® 12
9. VELASCO, M. V. R. ; SANTOS, I. M. N. S. S. ; DARIO, M. F. ; **FREIRE, T. B.** ; BABY, A. R. . Eficácia anticelulite de extratos de *Trichilia catigua* e *Ptychopetalum olacoides* Bentham. *BIOMEDICAL AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH*, v. 14, p. 45-49, 2017.

Capítulos de livros publicados

1. Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Claudineia ; Elyan Azevedo Martins, Tércio ; Miliani Martinez, Renata ; **BATELO FREIRE, THAMIRES** ; Valéria Robles Velasco, Maria ; Rolim Baby, André . *Vitamin E in Human Skin: Functionality and Topical Products*. Biochemistry. 1ed.: IntechOpen, 2021, v. , p. 1-
2. ★ APPAS, C. T. F. ; LADEIRA, A. D. S. ; **FREIRE, T. B.** ; LOPES, P. S. ; LEITE-SILVA, V. R. . *Moisturizers. Cosmetic Formulation: Principles and Practice*. 1ed.: CRC Press, 2019, v. , p. 11-12.

Textos em jornais de notícias/revistas

1. **FREIRE, T. B.**; VELASCO, M. V. R.; CARBINATTO, B. . Cremes à base de cafeína promovem combate à celulite. *AUN - AGÊNCIA UNIVERSITÁRIA DE NOTÍCIAS*, 03 jul. 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

1. DARIO, M. F. ; **FREIRE, T. B.** ; Forster, C. ; FUJII, L. S. ; SU, C. Y. ; SEMEDO, A. S. V. ; PINTO, C. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Mechanical resistance and combing of dyed hair exposed UV radiation. In: *Simpósio de Farmácia-USP, 2016, São Paulo. Simpósio de Farmácia 2016. São Paulo: Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences, 2016. v. 52. p. 17-17.*

Artigos aceitos para publicação

1. GUILLEN, J. S. Q. ; **FREIRE, T. B.** ; BABY, A. R. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; VELASCO, M. V. R. . Characterization and identification of ascorbyl methylsilanol pectinate for cosmetic formulations application. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE) **JCR**, 2021.
2. FRANCA-STEFONI, S. A. ; GAMA, R. M. ; **FREIRE, TB** ; PINTO, C. A. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Propriedades térmicas e mecânicas de cabelos submetidos a diferentes tratamentos cosméticos. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES (ONLINE) **JCR**, 2021.

Apresentações de Trabalho

1. **FREIRE, TB**. Nanotecnologia na cosmetologia, destacando as nanoemulsões. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. BABY, A. R.; MOROCHO'JÁCOME, ANA LUCÍIA; **FREIRE, TB**. Participação em banca de Ingrid Faria Lopes.Avaliação da fotoestabilidade de filtros solares encapsulados/incorporados em matriz mesoporosa ordenada do tipo SBA-15. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 32º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Antioxidante (resveratrol) como fotoestabilizador de filtro UVA (avobenzona) amplamente empregado em cosméticos. 2020. (Congresso).
2. 24o COLAMIC. Biodiversidade Brasileira. 2019. (Congresso).
3. 28th EADV Congress 2019, IFEMA, Feria de Madri, Espanha.. Antioxidants as photostabilizer of the UVA/UVB filters widely employed in cosmetics. 2019. (Congresso).
4. Curso preparatório TOEFL ITP.Curso preparatório TOEFL ITP. 2019. (Outra).
5. Curso Básico: Cabelo características, propriedades e produtos. 2018. (Outra).
6. ICAD BRAZIL. Eficácia de espécies vegetais na Hidrolipodistrofia ginoide. 2018. (Congresso).
7. ICAD BRAZIL. Relato de caso Peeling. 2018. (Congresso).
8. II Seminário quantitativo/Atualização em Cosmetologia. 2018. (Seminário).
9. Curso de Integração Educacional: jeito SENAC de educar - modelo pedagógico nacional (turma exclusiva).Curso de Integração Educacional: jeito SENAC de educar - modelo pedagógico nacional (turma exclusiva). 2017. (Outra).
10. ICAD BRAZIL. Action of desodorante and antiperspirant in the human body. 2017. (Congresso).
11. ICAD BRAZIL. Endermologia no tratamento da Hidrolipodistrofia ginoide. 2017. (Congresso).
12. Nutracêuticos e Nutricosméticos - Inovações e Tendências (28/10/10). 2017. (Outra).
13. EPIFAR.Apresentação das Linhas de Pesquisa do Laboratório de Cosmetologia. 2016. (Outra).
14. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2016. (Seminário).
15. Universidade Aberta à Terceira Idade da Universidade de São Paulo através da Atividade Didática Cultural intitulada: "Plantas Aromáticas e Especiarias em Saúde"as.Ministração da parte prática da aula: "Utilização de Plantas e Derivados em formulações cosméticas". 2016. (Outra).
16. Boas Práticas de Pipetagem.Boas Práticas de Pipetagem na Mettler Toledo. 2015. (Outra).
17. EPIFAR.Linhas de Pesquisa do Laboratório de Cosmetologia. 2015. (Outra).

18. ICAD BRAZIL. 2015. (Congresso).
19. Palestra "How to write a Scientific Article - What should I consider before". 2015. (Outra).
20. workshop: Boas Práticas de Pipetagem. 2015. (Outra).
21. workshop: Boas Práticas nas medições de pH. 2015. (Outra).
22. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Anti-cellulite action of nanoemulsion with caffeine. 2015. (Simpósio).
23. Semonário de Atualização em Técnicas de Aplicação de Injetáveis (8h). 2012. (Seminário).
24. A aplicação de radiofármacos na saúde (05/10/2011). 2011. (Exposição).
25. Alisamento e Relaxamento capilar, como atuam as diferentes tecnologias disponibilizadas pelo mercado cosmético (03/10/11). 2011. (Exposição).
26. Atuação do farmacêutico na rede de drogarias. 2011. (Exposição).
27. Inspeção em Indústria Farmacêutica (03/10/2011). 2011. (Exposição).
28. Planejamento de fármacos. 2011. (Exposição).
29. 4th Congress Consulfarma. Dúvidas Técnicas sobre matérias primas cosméticas. 2010. (Congresso).
30. A carcinogênese molecular e sua farmacoterapia básica (05/05/2010). 2010. (Outra).
31. Alimentos funcionais (06/10/10). 2010. (Exposição).
32. Assuntos regulatórios (07/10/10). 2010. (Exposição).
33. Bases da pesquisa clínica (07/10/10). 2010. (Exposição).
34. Farmacologia clínica aplicada a asma brônquica. 2010. (Simpósio).
35. Farmacovigilância (05/10/10). 2010. (Exposição).
36. Interações Medicamentosas como princípio básico na atenção farmacêutica (06/05/2010). 2010. (Simpósio).
37. Novas drogas e sistema nervoso central. 2010. (Exposição).
38. Palestra "Tendências Internacionais 2010 - Ativos inovadores para o tratamento da pele envelhecida e com desordens cutâneas" (17/06/10). 2010. (Outra).
39. Técnicas analíticas utilizadas em laboratório de toxicologia forense (06/10/10). 2010. (Exposição).
40. Toxicologia forense (04/10/2010). 2010. (Exposição).
41. Uso racional de antibióticos (04/10/2010). 2010. (Exposição).
42. Antibioticoterapia em Pacientes com Insuficiência Renal. 2009. (Simpósio).
43. Farmacoterapia nas Cefaléias em Geral. 2009. (Simpósio).
44. Helicobacter pylori e lesões gastrointestinais. 2009. (Outra).
45. Manejo Farmacológico dos Distúrbios Alimentares. 2009. (Simpósio).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **FREIRE, TB.** EPIFAR. 2019. (Outro).
2. **FREIRE, T. B.;** OLIVEIRA, A. C. . EPIFAR. 2019. (Outro).
3. **FREIRE, T. B.;** OLIVEIRA, A. C. . Comissão Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos. 2018. (Outro).
4. **BATELLO FREIRE, THAMIRE.** EPIFAR. 2018. (Outro).
5. **FREIRE, T. B.** Curso de Escola de Inverno: Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos (EPIFAR). 2016. (Outro).
6. **FREIRE, T. B.** Curso III Escola de Verão: Pesquisa e Inovação em Fármaco e Medicamentos (EPIFAR). 2016. (Outro).
7. **FREIRE, T. B.** EPIFAR. 2015. (Outro).

Inovação

Projetos de pesquisa

2018 - Atual

Influência de antioxidantes na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p-metoxicinamato de octila (fil fotoprotetores)