

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle de Fármacos

**Eficácia fotoprotetora do
ácido rosmarínico associado a filtros UVA e UVB**

Maíra de Oliveira Bispo

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle de Fármacos

**Eficácia fotoprotetora do
ácido rosmarínico associado a filtros UVA e UVB**

Maíra de Oliveira Bispo

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de

MESTRE

Orientado por:

Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo

2021

Maíra de Oliveira Bispo

Eficácia fotoprotetora do
ácido rosmarínico associado a filtros UVA e UVB

Comissão julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador/ Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ 2021.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

b621e bispo, maíra de oliveira
eficácia fotoprotetora do ácido rosmarínico
associado a filtros uva e uvb / maíra de oliveira
bispo. - São Paulo, 2021.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação
em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: baby, andré rolim

1. ácido rosmarínico. 2. fotoproteção. 3.
metoxicinamato de octila. 4. avobenzona. 5. fator
de proteção solar. I. T. II. baby, andré rolim,
orientador.

Dedicatória

Dedico essa Odisseia acadêmica,

Aos meus pais, Corina e Manoel (in memoriam).

Ao meu orientador e mestre,

Prof. Dr. André Rolim Baby

Agradecimentos

*À Deus, pela constante força, proteção, paz de espírito e segurança.
À minha amada mãe, ao meu pai (in memoriam), aos meus primos (Josie e Ederson), as minhas irmãs e ao meu noivo Rafael que sempre esteve lado a lado com todo apoio e confiança.*

Ao meu querido orientador e educador Profº. André Rolim Baby, por todo ensinamento e crescimento compartilhado. Você não foi apenas um orientador, mas um ser humano especial que me possibilitou ser uma pessoa melhor e querer ser melhor a cada dia.

À Prof.ª Vânia Rodrigues Leite que me incluiu nesse mundo mágico da cosmetologia e me fez acreditar que eu conseguiria.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, que muito me ensinaram nessa caminhada.

Aos amigos de laboratório que tornaram meus dias mais fáceis, alegres e acolhedores com todos os ensinamentos, risadas, desabaços, amizades, alegrias, choros e angústias: Amanda Beatriz, Tamires, Fernanda, Nádia, Claudinéia, Andressa, Edgar, Bruna, Fabiana, Renata e Talita. Obrigada por tudo!

Ao Profº. Felipe Rebello Lourenço pela imensa ajuda com as análises estatísticas.

À IPclin Instituto de Pesquisa Integrada pelas análises de FPS in vivo. E a todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

Epígrafe

*A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados pela
forma como nos acostumamos a ver o mundo*

Albert Einstein

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

BISPO, M.O. **Eficácia fotoprotetora do ácido rosmarínico associado a filtros UVA e UVB.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São de Paulo, São Paulo, 2021.

O conhecimento dos malefícios que a exposição à radiação ultravioleta (UV) promove na pele conduziu à conscientização da população para a utilização rotineira de fotoprotetores, tanto quanto, ao avanço nas pesquisas científicas com o intuito de melhorar a eficácia e segurança dessas formulações. Filtros solares tem a capacidade de refletir e/ou absorver a radiação UV, porém, não demonstram eficácia relevante contra os radicais livres. Os produtos naturais, em especial os compostos fenólicos, apresentam atividade antioxidante, assim, selecionou-se o princípio ativo de origem natural, ácido rosmarínico, um éster do ácido cafeico, com comprovados benefícios para o tecido cutâneo. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia fotoprotetora *in vitro* e *in vivo* de um sistema fotoprotetor contendo avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila, associados ou não ao ácido rosmarínico. As amostras fotoprotetoras foram preparadas com os filtros UV em duas concentrações distintas, contendo ou não o ácido rosmarínico a 0,05% (p/p) ou a 0,10% (p/p). A eficácia fotoprotetora foi determinada por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*), obtendo-se os valores de fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e comprimento de onda crítico (nm). Os valores de FPS *in vivo* foram determinados por meio protocolo amplamente reconhecido. Formulações fotoprotetoras contendo *p*-metoxicinamato de octila e avobenzona, associados ou não ao ácido rosmarínico, foram preparadas como emulsões O/A, com valores de pH compatíveis com o da pele. As amostras de melhor desempenho quanto à eficácia *in vitro* foram as F3 e F5, contendo 0,10% (p/p) do ácido rosmarínico; 10,0% (p/p) do filtro UVB *p*-metoxicinamato de octila; 2,5% (p/p) e 5,0% (p/p) de avobenzona, respectivamente. Nesta investigação, as amostras F1, F3 e F5 desenvolveram perfil de fotoinstabilidade na condição experimental adotada. O ácido rosmarínico 0,10% (p/p) demonstrou capacidade para elevar o valor de FPS *in vivo* da amostra F5 (10,0% (p/p) *p*-metoxicinamato de octila e 5,0% (p/p) de avobenzona) em mais de 43%, em comparação com F1 e F3, com constatado efeito sinérgico com o filtro UVA. Em função dos resultados dessa investigação, é permitido sugerir que a incorporação de compostos naturais com propriedades antioxidantes pode reduzir a proporção dos filtros UV tradicionais no produto final, com a vantagem de fornecer demais propriedades funcionais aos dermocosméticos. Investigações adicionais de concentrações mais elevadas de ácido rosmarínico e outras combinações de filtros UV podem agregar mais informações de relevância para o desenvolvimento de protetores solares bioativos multifuncionais.

Palavras-chave: Ácido rosmarínico. Fotoproteção. Metoxicinamato de octila. Avobenzona. Fator de proteção solar.

ABSTRACT

BISPO, M.O. **Photoprotective efficacy of rosmarinic acid associated with UVA and UVB filters.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São de Paulo, São Paulo, 2021.

The knowledge of the harmful effects that exposure to ultraviolet (UV) radiation causes on the skin has led to the population's awareness of the routine use of sunscreens, as well as the advancement in scientific research with the aim of improving the efficacy and safety of these formulations. Sunscreens have the ability to reflect and/or absorb UV radiation, however, they do not demonstrate relevant effectiveness against free radicals. Natural products, especially phenolic compounds, have antioxidant activity, so the active ingredient of natural origin was selected, rosmarinic acid, an ester of caffeic acid, with proven benefits for the skin tissue. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* photoprotective efficacy of a sunscreen system containing avobenzene and octyl *p*-methoxycinnamate, associated or not with rosmarinic acid. The samples were prepared with UV filters at two different concentrations, containing or not rosmarinic acid at 0.05% (w/w) or at 0.10% (w/w). The photoprotective efficacy was determined by diffuse reflectance spectrophotometry with an integrating sphere (Labsphere® UV2000S Ultraviolet Transmittance Analyzer), obtaining the values of sun protection factor (SPF) *in vitro* and critical wavelength (nm). *In vivo* SPF values were determined by a widely recognized protocol. Sunscreens containing octyl *p*-methoxycinnamate and avobenzene, associated or not with rosmarinic acid, were prepared as O/W emulsions, with pH values compatible with the skin. The samples with the best performance regarding *in vitro* efficacy were F3 and F5, containing 0.10% (w/w) of rosmarinic acid; 10.0% (w/w) UVB filter octyl *p*-methoxycinnamate; 2.5% (w/w) and 5.0% (w/w) of avobenzene, respectively. In this investigation, samples F1, F3 and F5 developed a photoinstability profile in the adopted experimental condition. Rosmarinic acid 0.10% (w/w) demonstrated the ability to increase the FPS value *in vivo* of the F5 sample (10.0% (w/w) octyl *p*-methoxycinnamate and 5.0% (w/w) of avobenzene) by more than 43% compared to F1 and F3, with a synergistic effect found with the UVA filter. Due to the results of this investigation, it is feasible to suggest that the incorporation of natural compounds with antioxidant properties can reduce the proportion of traditional UV filters in the final product, with the advantage of providing other functional properties to dermocosmetics. Further investigations of higher concentrations of rosmarinic acid and other combinations of UV filters may add more relevant information to the development of multifunctional bioactive sunscreens.

Keywords: Rosmarinic acid. Photoprotection. Octyl methoxycinnamate. Avobenzene. Sun protection factor.

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1: Equipamentos utilizados neste estudo.....17

Quadro 2: Matérias-primas e princípios ativos utilizadas neste estudo.....18

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Composição quantitativa e qualitativa (% p/p) das formulações.....	19
Tabela 2: Valores de FPS <i>in vitro</i> e pH das amostras fotoprotetoras (n=3).....	28
Tabela 3: Valores de comprimento de onda crítico (nm) das amostras fotoprotetoras (n=3).....	29

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido rosmarínico.....	5
Figura 2: Capacidade de penetração na pele da radiação UV	8
Figura 3: Estrutura química da avobenzona.....	10
Figura 4: Estrutura química do <i>p</i> -metoxicinamato de octila.....	10
Figura 5. Desenho ótico do espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração.....	12
Figura 6. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS), considerando 0,10% (p/p) de ácido rosmarínico nas concentrações mínimas e máximas dos filtros UV.....	31
Figura 7. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS) , considerando 2,50% (p/p) de avobenzona nas concentrações mínimas e máximas de ácido rosmarínico e do filtro <i>p</i> -metoxicinamato de octila.....	32
Figura 8. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS), considerando 5,0% (p/p) de avobenzona nas concentrações mínimas e máximas do ácido rosmarínico e do filtro <i>p</i> -metoxicinamato de octila.....	32
Figura 9. Fatores relevantes para a resposta da eficácia fotoprotetora das formulações.....	33
Figura 10. Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	34
Figura 11. Fator de proteção solar <i>in vivo</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS

λ crit - Comprimento de onda crítico

CEP – Comitê de ética em pesquisa

DEM – Dose eritematógena

EC – Estrato córneo

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FPS – Fator de Proteção Solar

INCI – *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

nm – um bilionésimo de metro

O/A – Óleo em água

pH – Potencial hidrogeniônico

UV – Ultravioleta

COOH – carboxila

-OH – hidroxila

mm – milímetro

μ m – micrometro

UVA-PF – Fator de proteção ultravioleta

PPD – *Persistent Pigment Darkening*

ISO – *International Organization for Standardization*

cm² – centímetro quadrado

cm – centímetro

W – Watts

%(p/p) – porcentagem peso por peso

° C – grau celsius

mg – miligramas

PMMA – Polimetilmetacrilato

W/m – Watts por minuto

IPClin – Instituto de Pesquisa Clínica

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Ácido Rosmarínico	5
2.2. Radiação Ultravioleta.....	6
2.3. Proteção Solar	9
2.4. Avaliação da Eficácia Fotoprotetora.....	11
2.5. Fotoestabilidade	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos gerais	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Equipamentos, Acessórios e Material.....	17
4.2. Preparação das formulações fotoprotetoras.....	18
4.3. Caracterização físico-química	20
4.4. Eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> e fotoestabilidade.....	21
4.5. Ensaio <i>in vivo</i> – Fator de Proteção Solar (FPS).....	22
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS	40

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos prejudiciais da exposição à radiação ultravioleta (UV) têm sido amplamente estudados nas últimas décadas, sendo um dos principais fatores que causam queimaduras e câncer de pele. O espectro de radiação UV é dividido em UVA, UVB e UVC, baseado no intervalo de comprimento de onda (nm). A radiação UVC possui o intervalo de comprimento de onda de 100 - 290 nm, a UVB entre 290 - 320 nm e a UVA de 320 - 400 nm (LOZANO *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2010).

Pesquisas demonstraram que, ao nível do mar, a radiação UVA compreende 95% da energia UV que atinge a superfície da Terra, tendo apenas 5% restante de radiação UVB (SAMBANDAN *et al.*, 2011). A radiação UVA, quando comparada à UVB, tem capacidade reduzida em causar eritema, porém, induz a pigmentação da pele por mecanismo imediato e penetra profundamente na derme. Assim, é uma das principais causadoras de espécies reativas de oxigênio (EROs). A radiação UVB promove o bronzeamento tardio, sendo restrita, principalmente, a epiderme, porém, frequente exposição pode causar lesões ao DNA, aumentando o risco de mutações que podem ser manifestadas em forma de câncer de pele. Nestes casos, os fotoprotetores são utilizados, principalmente, para prevenir a formação do eritema, pois diminuem a quantidade de radiação UV absorvida pela pele, reduzindo ainda mais o risco do câncer de pele (BABY *et al.*, 2015; BABY *et al.*, 2008).

Os filtros solares são moléculas ou complexos moleculares que, quando incorporadas em formulações, reduzem os efeitos UV na pele por absorção, reflexão ou dispersão da luz incidente. Eles podem ser divididos em duas classes: orgânicos ou inorgânicos, que agem por diferentes mecanismos. Os filtros orgânicos absorvem

a radiação UV e, os inorgânicos, refletem ou dispersam a radiação, podendo, também, absorver parte dela (MASNEC *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2015; VELASCO *et al.*, 2007; CESTARI *et al.*, 2012).

Formulações fotoprotetoras associadas a antioxidantes demonstraram aumentar a fotoproteção da pele, reduzindo os danos provocados pela radiação UV (MASNEC *et al.*, 2010). Diferentes moléculas endógenas e exógenas podem fornecer proteção eficiente contra a peroxidação lipídica: enzimas, vitamina E e polifenóis. Entre as diversas opções de antioxidantes exógenos, os polifenóis constituem, provavelmente, uma das classes mais eficientes de compostos contra o estresse oxidativo, tendo um importante papel na neutralização de radicais livres (FADEL *et al.*, 2011; BAHADORI *et al.*, 2019).

Há constatação do aumento do interesse da indústria em pesquisas com plantas ricas em substâncias fenólicas, pois extratos vegetais tem atividade antioxidante relevante e seu uso pode reduzir a concentração de filtros UV sintéticos, doando características multifuncionais às formulações, ainda, reduzindo o impacto ambiental (LUIS *et al.*, 2007; VELASCO *et al.*, 2008b).

O ácido rosmarínico é um éster do ácido cafeico, conhecido como um composto fenólico. Estudos evidenciaram que o ácido rosmarínico é um eficiente antagonista na peroxidação lipídica, sendo capaz de inserir-se espontaneamente em membranas lipídicas, com maior afinidade por lipídeos insaturados, bem como sua utilização no tratamento de dermatite atópica e no auxílio da fotoproteção (FADEL *et al.*, 2011; SVOBODOVÁ *et al.*, 2010). O ácido rosmarínico apresenta propriedades antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anticancerígena. Trata-se de um composto que é absorvido pelo trato gastrointestinal e penetra através da pele. Este promove aumento na produção de prostaglandina e reduz a produção de

leucotrienos, ademais, é um composto de grande interesse de estudo para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, com efeitos benéficos promotores da saúde, ainda com pesquisas restritas deste associado a filtros UV e fotoprotetores (PARK *et al.*, 2008; BAHADORI *et al.*, 2019).

Apesar de inúmeras estratégias de proteção contra a radiação UV, estas podem se demonstrar com parcial eficácia, pois podem não inibir a formação de radicais livres, sendo necessário adicionar antioxidantes e, neste caso em particular, o ácido rosmarínico foi acrescentado em amostras fotoprotetoras com o intuito de ampliar a eficácia contra a radiação UV (FREITAS *et al.*, 2015).

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico é um éster solúvel em água do 3,4-ácido dihidroxicinâmico e 3,4-dihidroxifenilactato: um composto fenólico natural que pode ser extraído da *Rosmarinus officinalis* L. Sua estrutura é composta por dois anéis fenólicos, onde apresentam dois grupos carboxilas na posição *orto* (**Figura 1**) (CAO *et al.*, 2005; MUÑOZ-MUÑOZ *et al.*, 2012).

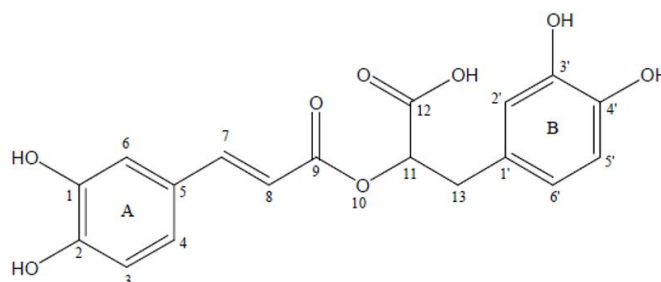


Figura 1. Estrutura química do ácido rosmarínico (CAO *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que o ácido rosmarínico possui atividades biológicas diversas, além da antioxidante, tais como antiviral, antibacteriana e anti-inflamatória (SÁNCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009). Os efeitos pró e antioxidantes estão relacionadas com a sua estrutura química, na qual os anéis difenólicos A e B podem ser oxidados por meio da auto-oxidação, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). A estrutura dos dois grupos catecóis conjugados com um grupo carboxílico é a responsável pela ação antioxidante da molécula, bem como, apresenta ação neutralizante das EROs, geradas na melanogêse, desempenhando efeito estimulador

neste processo (SÁNCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009). Em particular por sua propriedade antioxidante, atenção tem sido dada ao uso do ácido rosmarínico (ERKAN *et al.*, 2008).

Diversos extratos vegetais foram estudados quanto à atividade antioxidante, com o intuito de reduzir a utilização de antioxidantes sintéticos em alimentos e cosméticos e, entre eles, o ácido rosmarínico (*Rosmarinus officinalis* L.) apresentou destaque importante, pois possui ação no equilíbrio da atividade de certas enzimas responsáveis por processos fisiológicos, como: apoptose, promoção de tumor e sinal intracelular, entre outros (SÁNCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009; JUSTO *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o ácido rosmarínico reduziu significativamente o nível de EROs (HUANG *et al.*, 2006). Sua atividade antioxidante provoca eliminação de peróxido de hidrogênio e sequestra radicais livres devido ao seu grupo -COOH e simultaneamente elimina radicais livres por meio do grupo -OH (MUÑOZ-MUÑOZ *et al.*, 2012).

O ácido rosmarínico é um antagonista eficaz na peroxidação lipídica. Apresenta facilidade em penetrar nas membranas lipídicas insaturadas, pois possui estrutura compatível com lipídeos insaturados, sendo capaz de se infiltrar entre as moléculas polares. Possui capacidade de melhorar a estabilidade física e oxidativa dos lipossomas e, também, é capaz de reduzir a liberação de interleucina 6 (IL-6) (FADEL *et al.*, 2011; BULGAKOV *et al.*, 2011).

2.2. Radiação Ultravioleta

Os raios ultravioletas (UV) são abundantes no ambiente, sendo essencial para os seres humanos e, ao mesmo tempo, favorecendo uma gama de malefícios para a

pele, entre elas, o fotoenvelhecimento, inflamações, hiperemia, hiperalgesia e câncer. Cada elemento da radiação UV é capaz de causar diversos efeitos no corpo humano (DORAZIO *et al.*, 2013; CESTARI *et al.*, 2012). O espectro da luz solar se restringe a apenas 5% do espectro solar total, no entanto, tem impacto considerável no organismo humano. O espectro abrange a radiação UV, infravermelho e visível, com comprimento de onda de 100 nm a 1 mm (DUPONT *et al.*, 2013; FURUKAWA *et al.*, 2021).

A luz UV é dividida em UVC, UVB e UVA. A UVC apresenta energia alta e comprimento de onda de 100 a 290 nm; a UVB de 290 a 320 nm; a UVA I de 320 a 340 nm e, a UVA II, de 340 a 400nm. A radiação UVC não atinge a superfície terrestre, pois é bloqueada pela camada de ozônio. Os raios UVB são limitados na atmosfera, porque parte é captada pela camada de ozônio, porém, a radiação UVB é biologicamente ativa e penetra nas camadas superficiais da pele (**Figura 2**), causando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inflamações, envelhecimento precoce e queimadura. A radiação UVA está presente em maiores quantidades comparada com as demais, porém, é menos energética que a UVB, no entanto, também é capaz de causar malefícios ao corpo humano (DIFFEY *et al.*, 2000; DUPONT *et al.*, 2013).

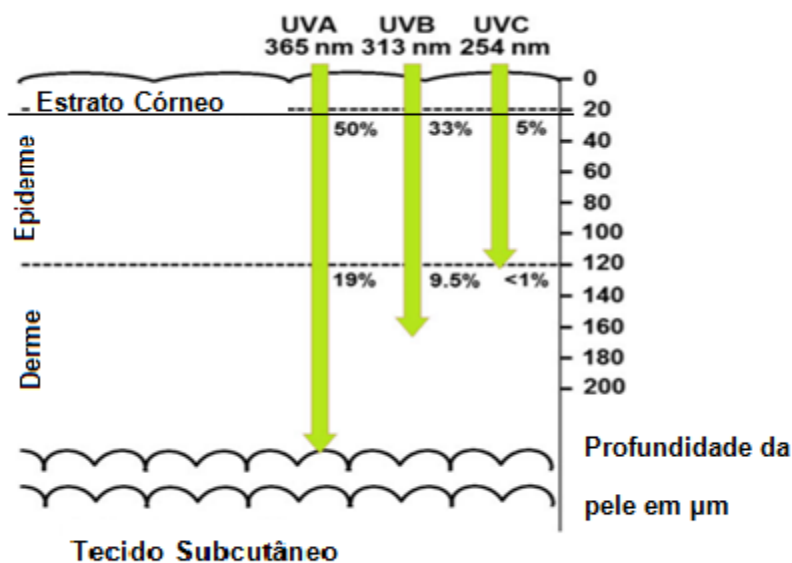


Figura 2. Capacidade de penetração na pele da radiação UV (adaptado de STIEFEL *et al.*, 2014)

A pele humana possui sensibilidade em relação à radiação UV, sendo a dose eritematogênica mínima (MED) uma medida biológica de exposição. A MED pode variar de acordo com o tipo de pele. A definição de tipo de pele foi definida por meio da escala de Fitzpatrick, que é semiquantitativa e composta por seis fototipos (SEITÉ *et al.*, 2010).

Dentre outros danos provocados pela radiação solar, há danos no DNA, sendo a radiação UVB absorvida diretamente pelo material genético. A UVA causa dano indireto, gerando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que danificam a dupla fita de DNA, causando alterações mutagênicas. Considerando o fotoenvelhecimento, a radiação UV induz resposta ao estresse oxidativo por meio das espécies reativas e sabe-se que a radiação UVB gera resposta menos pronunciada quando comparada à radiação UVA neste parâmetro (SEITÉ *et al.*, 2010; LEVI *et al.*, 2013).

2.3. Proteção Solar

O corpo humano tem mecanismo próprio de defesa contra a radiação UV, por exemplo, a pigmentação da pele por meio da melanina, o espessamento da camada córnea e o ácido urocânico (LIMA *et al.*, 2020). No entanto, tais recursos fisiológicos não são suficientes para a proteção da pele mediante a exposição exacerbada à radiação UV. Nos últimos anos, a população tem se conscientizado dos males que a exposição à radiação UV causa e, como reflexo, houve maior procura de cuidados buscando altos níveis de proteção solar, sendo a fotoproteção uma estratégia (HOJEROVÁ *et al.*, 2011).

Atualmente, são muitos os estudos que abordam os efeitos prejudiciais agudos e crônicos em relação à exposição aos raios UV. Tal exposição pode causar queimaduras solares, fotocarcinogênese, fotoimunossupressão e fotoenvelhecimento, por exemplo. No entanto, estratégias atuais são utilizadas para fotoproteção, dentre elas: uso de roupas com fator de proteção, fotoprotetor e evitar exposição ao sol. Dentre essas, a utilização de protetor solar é considerada uma das mais eficazes (BURNETT *et al.*, 2011).

Os protetores solares foram desenvolvidos com princípios ativos químicos (orgânicos) ou físicos (inorgânicos). Tais compostos tem a função de absorver, dispersar ou refletir a radiação UV, prevenindo o organismo dos danos e sinais do fotoenvelhecimento, câncer de pele e pigmentação. Estudos demonstraram que a utilização de protetor solar é eficaz e seu uso ao longo de 24 meses diminuiu o desenvolvimento de queratoses actínicas e carcinomas (SANDER *et al.*, 2020).

Existem filtros químicos e físicos. A avobenzona é um filtro químico UVA amplamente utilizada em fotoprotetores devido à sua ampla faixa de absorção,

apresentando pico máximo de 357 nm, podendo ser utilizado em concentrações de até 10,0%. No entanto, é um filtro fotoinstável devido à sua estrutura química (**Figura 3**), pois pode sofrer fotoisomerização reversível e/ou fotodegradação. Os efeitos de proteção a radiação UV são reduzidos, assim, é indicado a combinação com outros filtros UV (KAWAKAMI *et al.*, 2017; VALLEJO *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a incorporação de compostos naturais com efeito antioxidante em fotoprotetores com avobenzona tem ação favorável para aperfeiçoar sua fotoestabilidade em uma formulação (KAWAKAMI *et al.*, 2017).

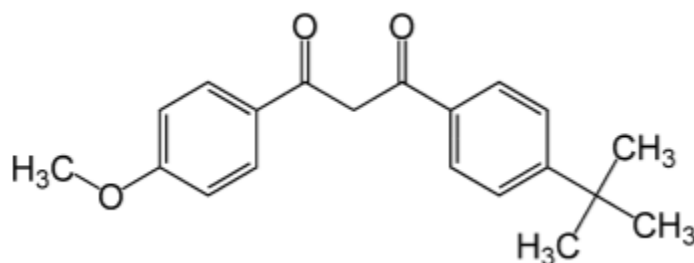


Figura 3. Estrutura química da avobenzona (YANG *et al.*, 2008)

O *p*-metoxicinamato de octila (**Figura 4**) é um filtro orgânico UVB, sendo um dos mais utilizados em função de sua eficácia. É considerável fotoinstável quando associado a determinados compostos, pois, quando exposto à luz solar, sofre fotoisomerização, no entanto, é indicado para uso cosmético por órgãos competentes, pois absorve os fótons de alta energia da radiação UVB com pico máximo de absorção em comprimento de onda de 311 nm (LORIGO *et al.*, 2019).

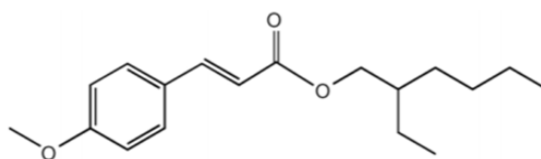


Figura 4. Estrutura química do *p*-metoxicinamato de octila (SCALIA *et al.*, 2006)

A utilização regular de fotoprotetor com fator de proteção solar (FPS) 30 ou superior em todos os tipos de pele é uma recomendação da Academia Americana de Dermatologia. A recomendação é que a aplicação seja em abundância e com reaplicação a cada 2 ou 3 horas (SANDER *et al.*, 2020). Mais recentemente, fotoprotetores associados a produtos naturais, em especial com reconhecida ação antioxidante, tem aumentado devido à sua eficácia melhorada por meio da interação entre a substância de origem natural e os filtros UV, bem como positiva interação com a pele (DONG *et al.*, 2019; YAROVAYA *et al.*, 2020).

2.4. Avaliação da Eficácia Fotoprotetora

Técnicas *in vitro* e *in vivo* são utilizadas para estimar/comprovar a eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas. Para tal, é necessário determinar o fator de proteção UVA (UVA-PF), que representa o nível de proteção contra a radiação UVA; o fator de proteção solar (FPS), responsável pela proteção contra a radiação UVB; e o comprimento de onda crítico (λ crit), que apresenta a amplitude de proteção contra a radiação UV (UNITED STATES, 2011). De acordo com a Legislação Brasileira, um produto é considerado fotoprotetor se apresentar FPS acima de 6, UVA-PF equivalente a, no mínimo 1/3 do FPS e valor de comprimento de onda crítico acima de 370 nm (BRASIL, 2012b).

O valor de FPS é a relação entre os raios UV necessário para causar uma DEM ou vermelhidão na pele protegida e os raios UV necessários para causar uma DEM na pele desprotegida (RICCI-JUNIOR *et al.*, 2013). Para avaliar a proteção UVA por meio de ensaio *in vivo*, pode-se utilizar o método PPD (*Persistent Pigment Darkening*). Este avalia as reações de pigmentos presentes na pele em relação com

a irradiação por UVA em condições muito bem controladas (COSMETICS EUROPE, 2006). O FPS pode ser realizado *in vivo* e/ou *in vitro*, no entanto, agências reguladoras exigem testes *in vivo* para a comprovação deste parâmetro. O método *in vivo* avalia a capacidade protetora contra as reações inflamatórias causadas pela radiação UV na superfície da pele. Este método sofreu diversas modificações em relação à legislação ao longo dos anos, no entanto, hoje está estabelecida pela norma ISO 24444:2010 (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020).

Um dos métodos *in vitro* utilizados para obter os parâmetros da fotoproteção é o que emprega a espectrofotometria difusa com esfera de integração, ilustrado na **Figura 5** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999). Os testes *in vitro* são utilizados para fins de seleção e/ou desenvolvimento. Este teste é baseado em medição espectrofotométrica, calculando a absorbância ou transmitância, quando a amostra é aplicada sobre um substrato. Os métodos se diferem no tipo de placa utilizada e na forma de aplicação do fotoprotetor (CVETKOVSKA *et al.*, 2016).



Figura 5. Desenho óptico do espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração

(adaptado de SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

2.5. Fotoestabilidade

A fotoestabilidade dos protetores solares é um dos fatores críticos para o seu desenvolvimento e seu desempenho. Considerando que os protetores solares são desenvolvidos com mais de um filtro UV, é indispensável que a mistura possua fotoestabilidade e, conseqüentemente, manutenção adequada do seu desempenho e segurança. A defesa contra a exposição aos raios UV e a redução dos efeitos da fotossensibilidade exigem que as formulações sejam fotoestáveis (KOCKLER *et al.*, 2012).

Mesmo filtros UV considerados fotoestáveis podem sofrer certa degradação em condições de exposição à luz, calor, tempo e umidade. Assim, o desenvolvimento de um novo fotoprotetor tem como objetivo a combinação de filtros UV que desenvolvam amplo espectro de proteção (FPS e UVA-PF), alta eficiência e, preferencialmente, baixo custo (NASH *et al.*, 2014). A fotoestabilidade é importante, também, para reduzir os perigos associados aos eventos adversos (ROMANHOLE *et al.*, 2016; NASH *et al.*, 2014).

A fotoestabilidade pode ser determinada *in vitro* por absorbância/transmitância ou por métodos analíticos, como espectroscopia de massa e cromatografia líquida de alto eficiência. A avobenzona é um exemplo de filtro UV que necessita de fotoestabilizador, em determinadas condições (NASH *et al.*, 2014)

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia fotoprotetora *in vitro* e *in vivo* de um sistema fotoprotetor contendo avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila, associados ou não ao ácido rosmarínico.

3.2. Objetivos específicos

Este estudo visou realizar as seguintes etapas:

i) Preparo de formulações fotoprotetoras compostas por *p*-metoxicinamato de octila e avobenzona, contendo ou não o ácido rosmarínico.

ii) Determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS e comprimento de onda crítico) das formulações por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.

iii) Obtenção do perfil da fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras.

iv) Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vivo* das amostras com melhor desempenho *in vitro*.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos, Acessórios e Material

Os equipamentos e aparatos empregados neste estudo estão descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1. Equipamentos utilizados neste estudo.

Equipamentos e acessórios	Marca e Modelo
Balança analítica	Shimadzu® AUY 220
Balança semi-analítica	Ohaus® ARD 110
Placa de aquecimento	IKA® HS7
Peagâmetro	Quimis® Q400 AS
Termômetro digital	JProlab®
Placas de 25 cm ² de polimetilmetacrilato (PMMA)	Heliplates®
Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração	Labsphere® UV 2000S (programa UV2000®)
Fonte de irradiação UV com lâmpada de arco de xenônio de 300 W	Multiport® 601 Solar Light® Co. Inc.

As matérias-primas e princípios ativos utilizados estão descritos no **Quadro 2**.

Quadro 2. Matérias-primas e princípios ativos utilizadas neste estudo.

Matéria-prima	Nomenclatura INCI*	Fornecedor
Crodafos™ CES	<i>Cetearyl Alcohol (and) Dicetyl Phosphate (and) Ceteth-10 Phosphate</i>	Croda®
Miristato de isopropila	<i>Isopropyl myristate</i>	Merck®
<i>p</i> -Metoxicinamato de octila	<i>Ethylhexyl methoxycinnamate</i>	Basf®
Avobenzona	<i>Butyl methoxydibenzoylmethane</i>	Mapric®
Glicerina	<i>Glycerin</i>	Mapric®
Euxyl® K300	<i>Phenoxyethanol (and) Methylparaben, Butylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben</i>	Schülke®
Aristoflex® AVC	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	Pharma Special®
Ácido rosmarínico	N/A	Sigma Aldrich®
Ácido cítrico	Citric Acid 10%	Mapric®
Trietanolamina	Triethanolamine	Merck®
Água purificada	Aqua	N/A
Etanol	Ethanol P.A.	Sigma Aldrich®

* Nomenclatura conforme INC - *Internacional nomenclature of cosmetics ingredients* (Nomenclatura Internacional de ingredientes cosméticos).

4.2. Preparação das formulações fotoprotetoras

Foram preparados sistemas emulsionados do tipo óleo-em-água (O/A), contendo o filtro solar UVB *p*-metoxicinamato de octila e o filtro solar UVA avobenzona, associados ou não ao ácido rosmarínico. As amostras com as combinações dos compostos foram definidas por meio do planejamento experimental do tipo fatorial com 12 fórmulas, conforme **Tabela 1**. Os filtros solares foram utilizados

em suas concentrações máximas permitidas pela legislação vigente (5,0% de avobenzona e 10,0% de *p*-metoxicinamato de octila) e foram conciliados com zero, 0,05% e 1,00% do composto bioativo ácido rosmarínico (BRASIL, 2006).

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

Composição	Função	Código das formulações / Proporção % (p/p)											
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Crodafos™ CE	Emulsificante	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Miristato de isopropila	Emoliente	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>p</i> -Metoxicinamato de octila	Filtro UV	10,0	5,0	10,0	5,0	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0
Avobenzona	Filtro UV	5,0	5,0	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5
Ácido rosmarínico	Composto Bioativo	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	-	0,05	-	-	0,05
Glicerina	Umectante	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>Phenoxyethan Methylparaben Butylparaben Ethylparaben Propylparaben and Isobutylparaben</i>	Conservante	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Aristoflex® AV	Polímero emulsificante	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Etanol	Solvente	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Água purificada	Veículo	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*Quantidade suficiente para 100%; (-) ausente na formulação

As matérias-primas foram pesadas em quantidades equivalentes de % (p/p) para 20,00 g de formulação, utilizando balança semi-analítica. Para manipular as formulações fotoprotetoras, as matérias-primas foram separadas em duas fases: aquosa e oleosa.

Os filtros UV e o Crodafos™ CES foram misturados com o miristato de isopropila, compondo a fase oleosa. A dissolução do composto bioativo foi realizada previamente em etanol. O Aristoflex® AVC, polímero com propriedades estabilizantes utilizado em ampla faixa de valor de pH (BRASIL, 2004; BRASIL, 2012C; COSMETICS EUROPE, 1997), foi misturado com a glicerina e o sistema conservante em água a 60°C, formando a fase aquosa. Em seguida, incorporou-se o composto bioativo em solução. A fase oleosa foi aquecida até 55°C e, então, as amostras foram armazenadas para que a fase oleosa obtivesse temperatura até 35°C e a fase aquosa até 40°C. Na sequência, a fase oleosa foi adicionada na fase aquosa para a obtenção da emulsão.

Todas as formulações geraram, no momento do preparo, valor de pH ácido, próximo de 3,0. Um dos fatores para essa resposta é a utilização da cera emulsificante ter em sua composição ácidos graxos. O valor de pH das formulações foi ajustado para o intervalo entre 5,0-6,0; com trietanolamina e ácido cítrico, à temperatura ambiente ($24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$).

As amostras foram armazenadas em embalagens de vidro transparente com tampa tipo rosca, à temperatura ambiente. Após 48 horas, foram observadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor).

4.3. Caracterização físico-química

O eletrodo do peagâmetro foi imerso diretamente nas formulações fotoprotetoras, à temperatura ambiente, para estabelecimento do valor de pH, em réplicas de três (VELASCO *et al.*, 2012).

4.4. Eficácia fotoprotetora *in vitro* e fotoestabilidade

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV2000S *Ultraviolet Transmittance Analyzer*). Para a análise do fator de proteção solar (FPS) e do comprimento de onda crítico (nm), alíquotas de formulações foram pesadas e aplicadas na forma de filme fino (1,3 mg/cm²) em movimentos circulares sobre o substrato de polimetilmetacrilato (placas de 25 cm² de PMMA, HD6, Heliplates®), em triplicata. Após secagem de 30 minutos, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica, considerando uma placa de PMMA contendo glicerina como branco. Foram realizadas nove leituras por placa. Os resultados de transmitância das amostras fotoprotetoras foram analisados em intervalo de comprimento de onda de 290 a 400 nm. Os valores foram convertidos e estimados como FPS e comprimento de onda crítico (nm) por meio do programa UV2000S® (VELASCO *et al.*, 2008b, 2008a; GRAZIOLA *et al.*, 2016; PERES *et al.*, 2016; SARRUF *et al.*, 2019).

A determinação da fotoestabilidade permite avaliar possíveis degradações que os filtros UV e demais princípios ativos, presentes no produto, possam sofrer quando expostos à radiação UV (BRASIL, 2012; UNITED STATES, 2011). Após a obtenção dos parâmetros de eficácia das amostras no ensaio da atividade fotoprotetora *in vitro*, as mesmas placas de PMMA, contendo as amostras, foram irradiadas por 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos com o simulador de irradiação UV (CPS+ Atlas Suntest®) equipado com lâmpada de xenônio, com irradiância a 580 W/m, correspondente à irradiância de 55 W/m no UV e temperatura de 35 °C (DIFFEY *et al.*, 2000). Após irradiação, calcularam-se o FPS e comprimento de onda crítico, os quais foram

comparados com aqueles da pré-irradiação. As análises foram realizadas em triplicata (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; ROSADO *et al.*, 2019).

4.5. Ensaio *in vivo* – Fator de Proteção Solar (FPS)

As formulações fotoprotetoras com melhor desempenho no teste de eficácia fotoprotetora *in vitro* foram submetidas ao estudo de FPS *in vivo*. O ensaio foi realizado pelo Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda. (IPclin), Jundiaí-SP, Brasil, por meio do protocolo da norma ISO 24444:2010 – *Cosmetics Sun Protection Test Methods – In vivo determination of the sun protection factor (SPF)*. O presente ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob o parecer Nº 2020.2190, em função da realização dos ensaios *in vivo*. Este estudo foi realizado em acordo com a Legislação Brasileira vigente e com a Declaração de Helsinki. Para cada participante que manifestou interesse em compor parte desta pesquisa, foram fornecidas as informações e os esclarecimentos necessários referentes ao ensaio. Após os esclarecimentos, forneceu o seu consentimento por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), mantendo-se o anonimato do participante e garantindo a sua saída do estudo, voluntariamente, a qualquer momento durante a pesquisa (BRASIL, 2012).

Foram selecionados 10 participantes de acordo com os termos de exclusão e inclusão estabelecidos pelo Centro de Pesquisa e protocolo utilizado, que apresentaram idade entre 20 e 50 anos, fototipos II a III e sexo feminino. Os participantes tinham, como restrição, não realizar tratamentos estéticos e/ou dermatológicos durante o estudo e não fazer uso de medicações, como anti-

inflamatórios, anti-histamínicos, imunossupressores, vitamina A ácida e derivados (ROSADO *et al.*, 2019).

A DEM é considerada como a quantidade de energia radiante necessária para produzir a menor perceptível e indubitável vermelhidão, avaliada de 16 a 24 horas após a exposição. A DEM de cada participante foi determinada por uma sequência de exposição à luz UV, com intensidade (DEM/minuto) aumentada em progressão geométrica, sendo cada exposição graduada com aumento de 12% em relação à anterior (1,12ⁿ). Após 16-24 horas da irradiação foi feito o exame dermatológico local para verificação dos pontos com aparecimento de eritema (*Cosmetics Sun protection test methods – In vivo determination of sunscreen ISO 24442:2010*).

No dorso (região infraescapular) de cada participante foram demarcados sítios com auxílio de caneta cirúrgica na forma de retângulos de 5,0 x 7,0 cm (35 cm²). Os sítios foram limpos com algodão seco. Nos sítios demarcados foram aplicados 2,0 mg/cm² das amostras em avaliação ou do Produto Padrão, espalhando-os homogeneamente. Após a aplicação, os participantes aguardaram 15 minutos para a secagem. Na sequência, foi feita a irradiação do sítio, considerando o tempo definido da DEM individual e o FPS esperado do produto. Entre 16-24 horas após a irradiação, foi realizado o exame dermatológico local para a determinação do FPS. O valor do FPS foi calculado pela **Equação 1**.

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM da pele protegida}}{\text{DEM da pele desprotegida}}$$

Equação 1. Equação para cálculo do fator de proteção solar.

DEM = dose eritematogena mínima.

Para cada participante foi calculado o valor do FPS *in vivo*. Para o painel de participantes foi calculado o FPS médio, o desvio padrão e o limite inferior do intervalo de confiança 95% (Cosmetics Sun protection test methods – In vivo determination of sunscreen ISO 24442:2010).

4.6. Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa Minitab® versão 19. As análises foram realizadas em triplicata, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram analisados em ANOVA, por regressão e teste de Tukey.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fotoprotetores são, essencialmente, utilizados para a prevenção do desenvolvimento de eritemas provocados pela radiação solar. Em tais preparações, o emprego de substâncias de origem natural tem sido foco de estudos diversos descritos na literatura especializada, sendo não apenas justificada pela tendência mundial de uso de compostos obtidos da natureza, como, também, por esses ingredientes bioativos apreciarem eficácia e presumível segurança, mínimo impacto ambiental e sustentabilidade, e funções biológicas diversas (VELASCO *et al.*, 2008b).

As formulações dos protetores solares são desenvolvidas com o objetivo de entregar, na superfície cutânea, os benefícios relacionados com o conjunto de princípios ativos veiculados no produto, ademais de outras atribuições, relacionadas com a composição do veículo propriamente dito, a saber: emoliência, hidratação, substantividade à pele e mínima ou ausência de migração do filme da preparação para vestimentas, entre outras. Considerando tais particularidades, as emulsões são formas farmacêuticas adequadas para o desenvolvimento de fotoprotetores (TANNER *et al.*, 2006; VELASCO *et al.*, 2008b).

Neste estudo, foi avaliada a influência do ácido rosmarínico, bem como sua interação com os filtros avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila, em formulações multifuncionais. Foi realizado delineamento experimental (DoE) do tipo fatorial para o desenvolvimento de 12 amostras (F1 a F12) em veículo emulsionado O/A, sendo a totalidade das formulações consideradas macroscopicamente estáveis, com valor de pH compatível com o da pele e características organolépticas (aspecto, cor e odor) adequadas (TANNER *et al.*, 2006).

Os estudos sobre fotoproteção bioativa multifuncional consideram que a preparação desempenha funções aditivas da proteção solar, como, por exemplo, a ação antioxidante. Dentre os benefícios esperados, pode-se ressaltar o sinergismo entre o composto bioativo e os filtros solares tradicionais. Por esse cenário, a utilização do DoE foi relevante para auxiliar na avaliação e seleção das combinações de melhor resultado, envolvendo o ácido rosmarínico e os filtros UV (TANNER *et al.*, 2006; MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020).

As formulações fotoprotetoras foram analisadas visualmente 48 horas após sua preparação, com o intuito de verificar as características organolépticas e possíveis sinais de instabilidade. As amostras, independentemente do acréscimo do ácido rosmarínico e da concentração dos filtros, desenvolveram coloração branca, aspecto homogêneo, consistência aparentemente elevada e odor característico. Macroscopicamente, as amostras não apresentaram diferença quanto ao aspecto. A consistência da formulação, com aspecto de creme, foi esperada, em função da concentração de Aristoflex® AVC (1,0% p/p) e de Crodafos™ CES (4,0% p/p). O intervalo de valor de pH das amostras, após ajuste com trietanolamina e/ou ácido cítrico, foi entre 5,2 a 5,9. Tal intervalo de valor de pH foi definido com o intuito de obter um meio próximo ao valor de pH da pele (4,6 – 5,8) para contribuir com a manutenção da fisiologia da superfície cutânea e estabilidade dos componentes das amostras (LEONARDI *et al.*, 2002). Os valores de pH das formulações estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de FPS *in vitro* e pH das amostras fotoprotetoras (n=3).

Formulações	Valor de FPS	Valor de pH
F1	12,00 ± 1,73 ^{BC}	5,67
F2	8,34 ± 0,58 ^{CD}	5,90
F3	15,67 ± 3,51 ^{AB}	5,95
F4	4,00 ± 1,00 ^E	5,81
F5	17,33 ± 0,58 ^A	5,68
F6	9,00 ± 2,00 ^{CDE}	5,62
F7	9,67 ± 0,58 ^{CD}	5,24
F8	11,67 ± 1,53 ^{BC}	5,92
F9	11,67 ± 0,58 ^{BC}	5,38
F10	8,00 ± 1,53 ^{CDE}	5,95
F11	5,00 ± 0,00 ^E	5,87
F12	6,00 ± 0,58 ^{DE}	5,96

*As formulações, em função do valor do fator de proteção solar (FPS), que não compartilham uma letra, são diferentes.

A eficácia fotoprotetora *in vitro* foi determinada por espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. Os valores de transmitância no intervalo de comprimento de onda UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm) foram convertidos pelo programa acoplado ao equipamento, resultando nos valores de FPS e comprimento de onda crítico (nm), conforme **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 3: Valores de comprimento de onda crítico (nm) das amostras fotoprotetoras (n=3).

Formulações*	Valores de comprimento de onda (nm)
F1 ^{BC}	382,67 ± 0,58
F2 ^{AB}	383,67 ± 0,58
F3 ^F	379,34 ± 0,58
F4 ^{DE}	381,00 ± 0,00
F5 ^{CD}	381,67 ± 0,58
F6 ^C	382,34 ± 0,58
F7 ^C	382,34 ± 0,58
F8 ^{EF}	380,00 ± 0,00
F9 ^F	379,34 ± 0,578
F10 ^A	384,00 ± 0,00
F11 ^{CD}	382,00 ± 0,00
F12 ^{DE}	381,00 ± 0,00

*As formulações que não compartilham uma letra, são diferentes.

A eficácia fotoprotetora pode ser obtida por meio de técnicas *in vitro* ou *in vivo* (VELASCO *et al.*, 2011). Segundo a Legislação Brasileira, as formulações são classificadas como fotoprotetoras quando apresentam valor de FPS acima de 6, FPUVA (proteção UVA) com valor correspondente a 1/3 do valor do FPS e comprimento de onda crítico acima de 370 nm (BRASIL, 2012). Pelo exposto, dentre as formulações, definidas no planejamento experimental do tipo fatorial, constatou-se que somente as F4 e F11 não desenvolveram eficácia adequada, com FPS igual a 4,00 ± 1,00 e 5 ± 0,00; respectivamente.

As amostras F3 e F5, ambas contendo 0,10% (p/p) do ácido rosmarínico, foram as que apresentaram valores superiores de FPS, $15,67 \pm 3,51$ e $17,33 \pm 0,58$; respectivamente. No entanto, não se diferiram entre si. Observou-se que a redução na concentração da avobenzona em F3 não resultou em perda significativa de proteção anti-UVB. Tal perfil de resposta poderia ser considerado vantajosa, pois houve manutenção da eficácia com menor concentração de filtro UV. Assim, verificou-se que o composto bioativo exerceu interação mais pronunciada com o *p*-metoxicinamato de octila, potencializando o FPS. Segundo (YANG *et al.*, 2008), a avobenzona possui um pico de absorção em 360 nm e, segundo (LINARES *et al.*, 2011), o ácido rosmarínico apresenta pico máximo de absorção entre 290 e 328 nm. Assim, o composto bioativo contribuiu com a absorção da radiação no intervalo do UVB, corroborando com as respostas aqui apresentadas. A considerar os valores do comprimento de onda crítico (90% da curva integral), a totalidade das amostras desenvolveu valores acima de 370 nm, sugerindo potencial para proteção de amplo espectro (VELASCO *et al.*, 2011).

A **Figura 6** ilustra o gráfico de superfície de resposta das formulações fotoprotetoras para o FPS em função do *p*-metoxicinamato de octila e da avobenzona, na totalidade de suas concentrações, com o ácido rosmarínico em concentração igual a 0,10% (p/p). Nas condições descritas, observou-se que a avobenzona a 5,0% (p/p) apresentou tendência para promover o aumento de FPS quando o filtro UVB estava em sua menor concentração. No entanto, quando o *p*-metoxicinamato de octila foi empregado em sua concentração maior, na presença de 0,10% (p/p) do ácido rosmarínico, o filtro UVA não desempenhou contribuição para o FPS.

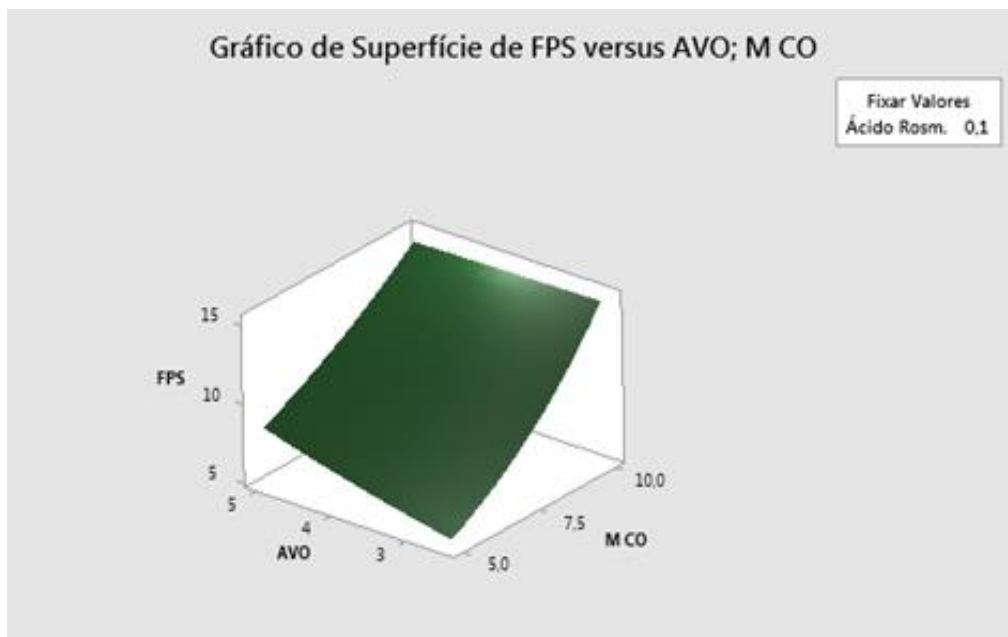


Figura 6. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS), considerando 0,10% (p/p) de ácido rosmarínico nas concentrações mínimas e máximas dos filtros UV.

Nas **Figuras 7 e 8**, verificou-se que o desempenho para o FPS das amostras foi mais proeminente nas concentrações superiores do *p*-metoxicinamato de octila 10% (p/p) e do ácido rosmarínico 0,10% (p/p). A avobenzona, em ambas as concentrações, pareceu não contribuir para este perfil de resposta, o que sugeriu maior afinidade do ácido rosmarínico com o filtro solar UVB (*p*-metoxicinamato de octila) em sua maior concentração.

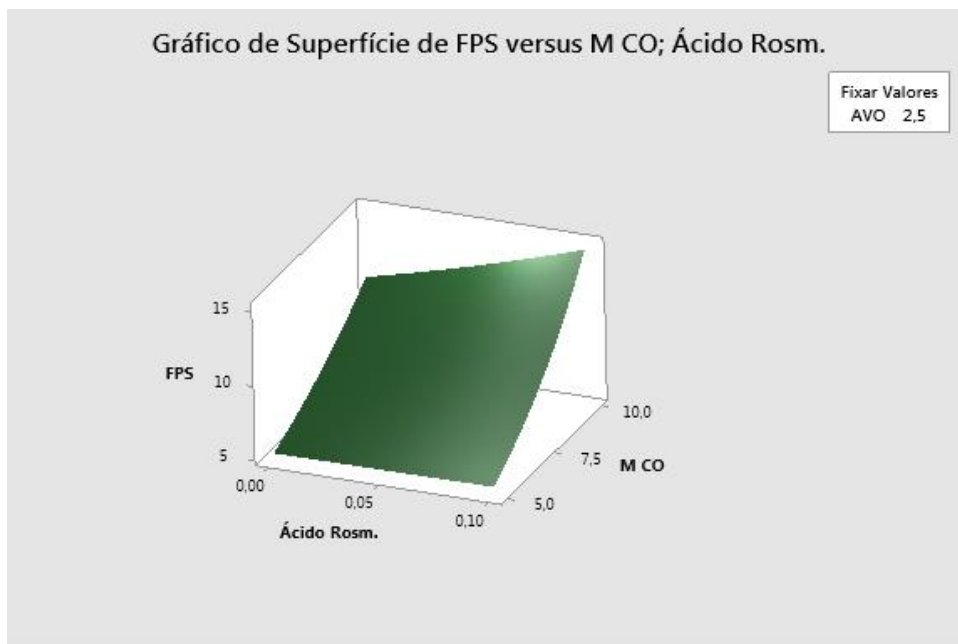


Figura 7. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS) , considerando 2,50% (p/p) de avobenzona nas concentrações mínimas e máximas de ácido rosmarínico e do filtro *p*-metoxicinamato de octila.

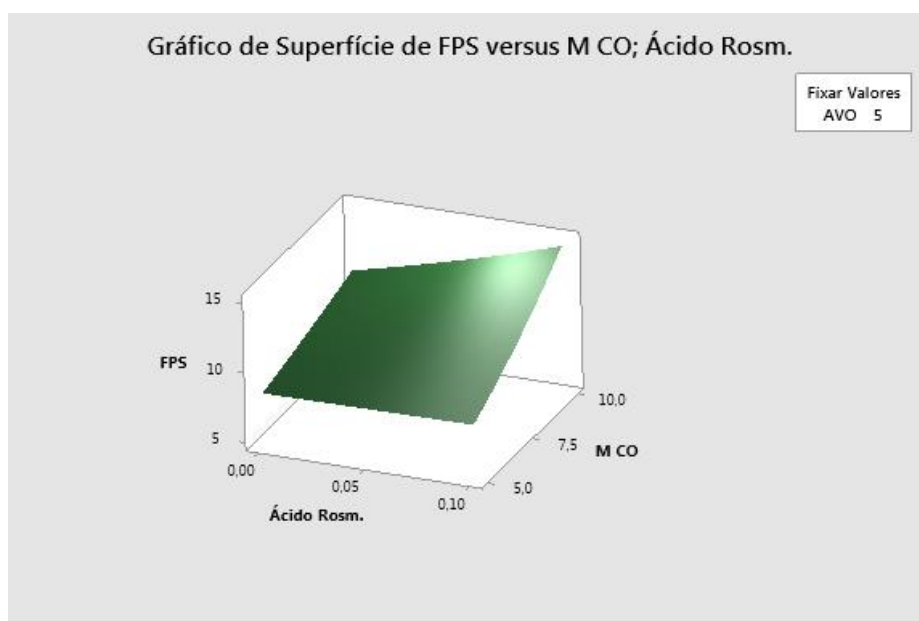


Figura 8. Superfície de resposta do fator de proteção solar (FPS), considerando 5,0% (p/p) de avobenzona nas concentrações mínimas e máximas do ácido rosmarínico e do filtro *p*-metoxicinamato de octila.

A **Figura 9** ilustra os fatores de relevância (gráfico de Pareto) para resposta da eficácia fotoprotetora das formulações. O *p*-metoxicinamato de octila foi o fator mais

acentuado, seguido da avobenzona, da associação do filtro UVB com o filtro UVA e, por fim, da associação do *p*-metoxicinamato de octila com ácido rosmarínico. O composto bioativo isolado não foi identificado como fator de relevância para o FPS, no entanto, possuiu interação positiva com o *p*-metoxicinamato de octila para este parâmetro da eficácia fotoprotetora. Os gráficos de superfície de resposta corroboraram com este fenômeno, ilustrado no gráfico de Pareto (**Figura 9**).

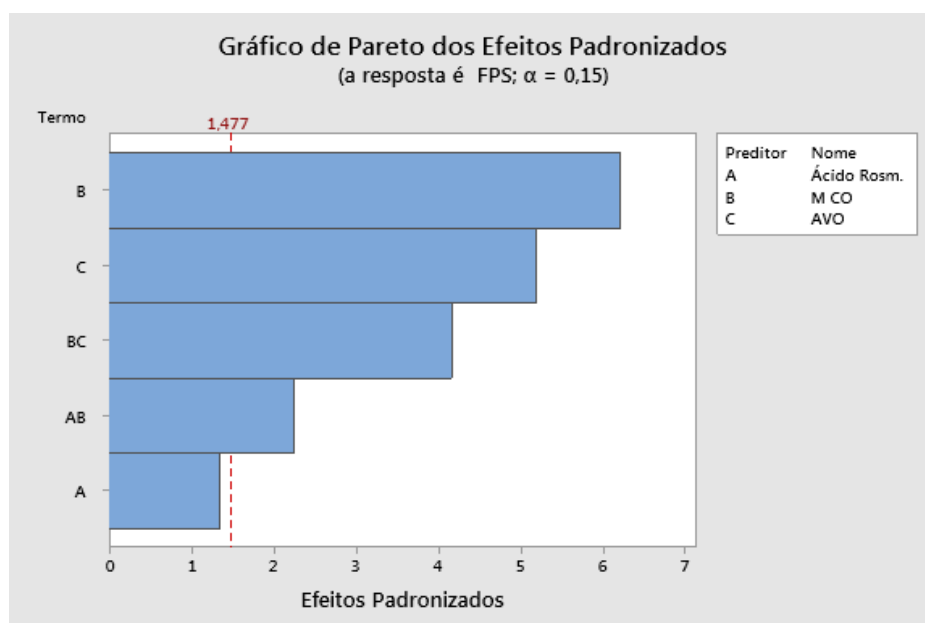


Figura 9. Fatores relevantes para a resposta da eficácia fotoprotetora das formulações. **A:** ácido rosmarínico; **B:** *p*-metoxicinamato de octila; **C:** avobenzona

Em função dos perfis dos resultados da eficácia *in vitro*, as amostras de melhor desempenho foram as F3 e F5, contendo 0,10% (p/p) do ácido rosmarínico, 10,0% (p/p) do filtro UVB *p*-metoxicinamato de octila, 2,5% (p/p) e 5,0% (p/p) de avobenzona, respectivamente. Tais formulações foram selecionadas para o estudo da fotoestabilidade e determinação do FPS *in vivo*, sendo a amostra F1 (10,0% (p/p) do *p*-metoxicinamato de octila e 5,0% (p/p) da avobenzona) avaliada concomitantemente, com a finalidade de comparação.

O ensaio da fotoestabilidade aplicado nas amostras F1, F3 e F5 demonstrou que o ácido rosmarínico 0,1% (p/p) não desempenhou ação protetora adequada. Após 30 minutos de irradiação artificial, F1 teve redução de 44% no valor do FPS *in vitro*, enquanto F3 e F5 obtiveram diminuição neste mesmo parâmetro de 34 e 45%, respectivamente (**Figura 10**). Quanto ao comprimento de onda crítico, a amostra F3 foi aquela de maior sensibilidade ao ensaio, no entanto, a totalidade das formulações demonstrou redução no valor do comprimento de onda crítico após 120 minutos de irradiação (**Figura 10**). A presença do ácido rosmarínico 0,1% (p/p) poderia ter contribuído com a fotoestabilidade destes sistemas, considerando que a literatura especializada aprecia registros de compostos antioxidantes associados a filtros UV com melhorias no perfil da estabilidade funcional das amostras (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020), porém, nesta investigação, todas as formulações desenvolveram resposta de fotoinstabilidade na condição experimental adotada.

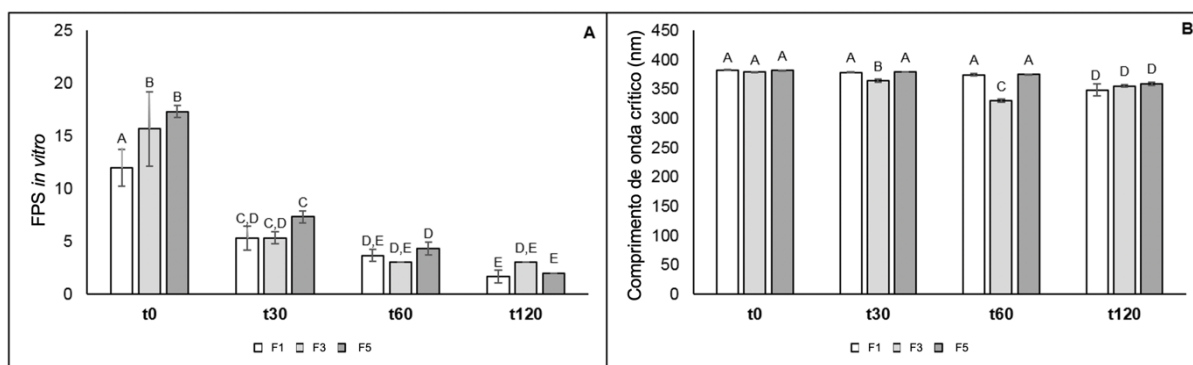


Figura 10. Fator de proteção solar (FPS) *in vitro* (A) e comprimento de onda crítico (nm) (B) antes e após irradiação artificial. Amostras que compartilham mesma letra são estatisticamente iguais ($p \leq 0.05$). Sem irradiação (t0), 30 minutos (t30), 60 minutos (t60) e 120 minutos (t120) de irradiação.

As amostras fotoprotetoras, também, foram avaliadas por ensaio *in vivo*, para o FPS, resultando em significativo aumento de, pelo menos, 43% para F5, quando comparada com F1 e F3 (**Figura 11**), isto é, F5 gerou FPS *in vivo* igual a 18,7;

enquanto F1 e F3 obtiveram valores de 13,0 e 10,9; respectivamente. Ressalta-se que as amostras F1 e F3 não diferiram estatisticamente em seus resultados. Considerando que F3 possuiu a metade da concentração de avobenzona, o ácido rosmarínico desempenhou efeito sinérgico com esse filtro UVA, melhorando sua eficácia.

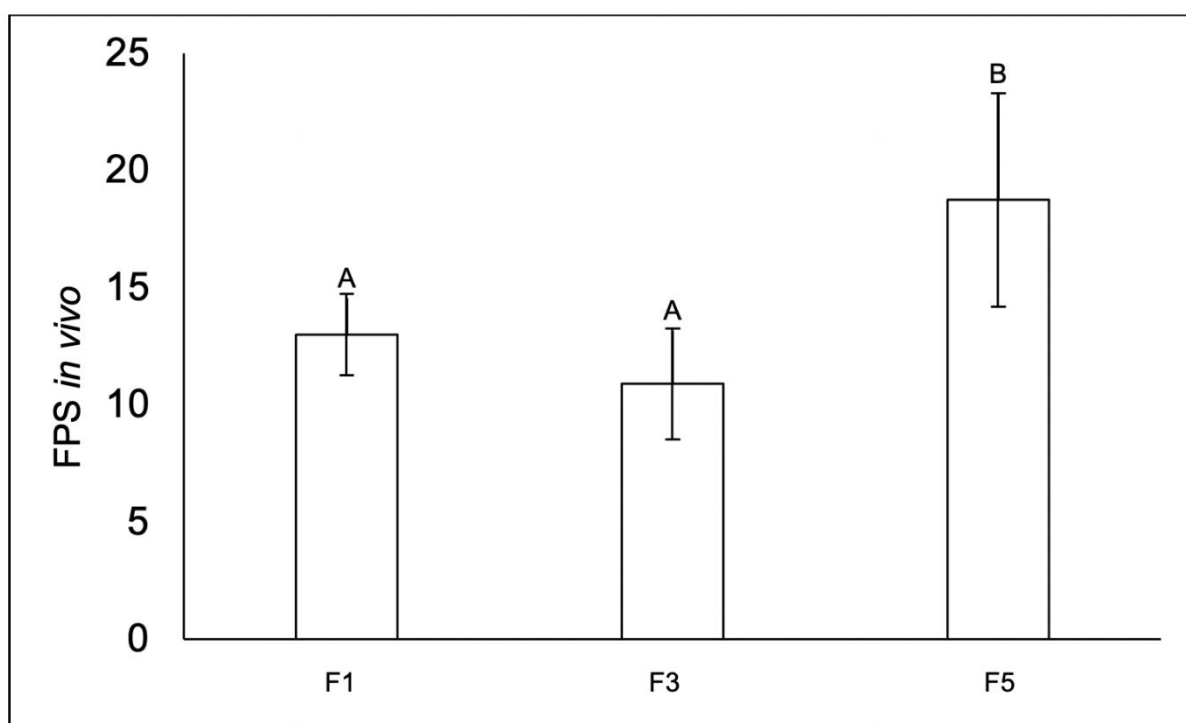


Figura 11. Fator de proteção solar *in vivo* (n=10 participantes). Amostras que compartilham mesma letra são estatisticamente iguais ($p \leq 0.05$).

Segundo (TORRES *et al.*, 2020) o uso de antioxidantes concomitantemente com filtros UV resultaram em melhorias no valor de FPS, redução do eritema induzido pela radiação UVB e diminuição da aspereza da superfície cutânea provocada pela radiação UVA. Os mecanismos de ação aceitáveis para a explicação do aumento do desempenho funcional de amostras bioativas multifuncionais, com particular atenção para aquelas contendo ingredientes ativos antioxidantes, poderiam estar relacionados com a capacidade dessas moléculas em absorver a radiação UV em montante

considerável, reduzir ou retardar a resposta inflamatório resultante da exposição à radiação UV e, também, diminuir o estresse oxidativo (PERES *et al.*, 2018).

Em relação ao ácido rosmarínico, investigação envolvendo sua administração oral demonstrou que este composto foi capaz de diminuir o tempo necessário para a formação de malonaldeído, um biomarcador da peroxidação lipídica, e regulação positiva da atividade da tirosinase, com consequente estímulo da formação de melanina (SÁNCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009), portanto, ácido rosmarínico poderia induzir mecanismos de defesa endógena, ademais de exercer ação antirradicalar. O extrato de *Plectranthus ecklonii* Benth a 10,0% (p/v), rico em ácido rosmarínico, associado com a benzofenona-4 a 6,0% (p/v), induziu incremento de 19,49% no valor do FPS *in vitro* da mistura. Ademais, a permeação cutânea, a atividade antibacteriana, a inibição da acetilcolinesterase e a ausência de citotoxicidade estabelecida em cultura de queratinócitos humanos revelaram a atividade multifuncional do ácido rosmarínico, derivado de recursos naturais, para a produção de dermocosméticos (NICOLAI *et al.*, 2020).

Em suma, em função dos resultados dessa investigação, é permitido sugerir que a incorporação de compostos naturais com propriedades antioxidantes pode reduzir a proporção dos filtros UV tradicionais no produto final, com a vantagem de fornecer demais propriedades funcionais aos dermocosméticos. Investigações adicionais de concentrações mais elevadas de ácido rosmarínico e outras combinações de filtros UV podem agregar mais informações de relevância para o desenvolvimento de protetores solares bioativos multifuncionais.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Formulações fotoprotetoras contendo *p*-metoxicinamato de octila e avobenzona, associados ou não ao ácido rosmarínico, foram preparadas como emulsões O/A, com valores de pH compatíveis com o da pele.

As amostras de melhor desempenho quanto à eficácia *in vitro* foram as F3 e F5, contendo 0,10% (p/p) do ácido rosmarínico; 10,0% (p/p) do filtro UVB *p*-metoxicinamato de octila; 2,5% (p/p) e 5,0% (p/p) de avobenzona, respectivamente. Nesta investigação, as amostras F1, F3 e F5 desenvolveram perfil de fotoinstabilidade na condição experimental adotada.

O ácido rosmarínico 0,10% (p/p) demonstrou capacidade para elevar o valor de FPS *in vivo* da amostra F5 (10,0% (p/p) *p*-metoxicinamato de octila e 5,0% (p/p) de avobenzona) em mais de 43%, em comparação com as demais amostras, com constatado efeito sinérgico com o filtro UVA.

Referências

REFERÊNCIAS

BABY, André Rolim *et al.* Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 233-248, jun. 2008.

BABY, André Rolim *et al.* Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA suncare products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p.154-159, 2015.

BAHADORI, Mir Babak *et al.* Phenolic ingredients and therapeutic potential of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea* for the management of oxidative stress, Alzheimer's disease, hyperglycemia, and melasma. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 127, p. 82-87, jan. 2019.

BULGAKOV, Victor P. *et al.* Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. **Critical Reviews In Biotechnology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 203-217, 12 ago. 2011.

BURNETT, Mark E. *et al.* Current sunscreen controversies: a critical review. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 58-67, 10 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004, v.1, 45p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 4, de 16 de março de 2006. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução no 466**, de 12 de dezembro de 2012b. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília, 2012c, v.1, 74p.

CAO, Huai *et al.* DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. **Journal Of Molecular Structure: THEOCHEM**, [S.L.], v. 719, n. 1-3, p. 177-183, abr. 2005.

CESTARI, T. Ferreira *et al.* Photoprotection et maladies cutanées. **Annales de Dermatologie Et de Vénérologie**, [S.L.], v. 139, p. 83-91, nov. 2012.

CHANG, Ni-Bin *et al.* Skin cancer incidence is highly associated with ultraviolet-B radiation history. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 213, n. 5, p. 359-368, set. 2010.

COSMETICS EUROPE. **Product test guidelines for the assessment of human skin compatibility**. Brussels, 1997, 26 p. 1997.

COSMETICS EUROPE. International Sun Protection Factor (SPF) test method. Brussels, 2006, 44 p.

CVETKOVSKA, A. Dimitrovska *et al.* Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 310-319, 8 dez. 2016.

DE OLIVEIRA, C.A. Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina. São Paulo. 2015. 190p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DIFFEY, Brian L. *et al.* In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 1024-1035, dez. 2000.

DONG, Yuan *et al.* Perspectives on the Next Generation of Sunscreen: safe, broadband, and long-term photostability. **Acs Materials Letters**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 336-343, 2 ago. 2019.

D'ORAZIO, John *et al.* UV Radiation and the Skin. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 7 jun. 2013.

DUPONT, E. *et al.* Beyond UV radiation: a skin under challenge. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 224-232, 14 fev. 2013.

ERKAN, Naciye *et al.* Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 76-82, set. 2008.

FADEL, Ophélie *et al.* The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1808, n. 12, p. 2973-2980, dez. 2011.

FREITAS, Juliana Vescovi *et al.* Photostability evaluation of five UV-filters, trans-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 78, p. 79-89, out. 2015.

FURUKAWA, Juliana Yuka *et al.* Skin impacts from exposure to ultraviolet, visible, infrared, and artificial lights – a review. **Journal Of Cosmetic And Laser Therapy**, [S.L.], v. 23, n. 1-2, p. 1-7, 17 fev. 2021.

GRAZIOLA, Fabiana *et al.* Gelatin-based microspheres crosslinked with glutaraldehyde and rutin oriented to cosmetics. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 603-612, dez. 2016.

HOJEROVÁ, J. *et al.* Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 408, n. 1-2, p. 27-38, abr. 2011.

HUANG, Shuang-Sheng *et al.* Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 239, n. 2, p. 271-280, ago. 2006.

INTERNATIONAL STANDARD – ISO 24444:2010 – Cosmetics – Sun protection test methods – In vivo determination of the sun protection factor (SPF) 1 ed., November 15 2010.

JUSTO, R. O. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, V. 31, n.7, p. 169 – 1705, 2008.

KAWAKAMI, Camila Martins *et al.* Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB) as additive to the UV filter avobenzene in cosmetic sunscreen formulations - Evaluation of the photochemical behavior and photostabilizing effect. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 99, p. 299-309, mar. 2017.

KOCKLER, Jutta *et al.* Photostability of sunscreens. **Journal Of Photochemistry And Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 91-110, mar. 2012.

LEONARDI, Gislaine Ricci *et al.* Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 77, n. 5, p. 563-569, out. 2002.

LEVI, K. UV damage and sun care: deciphering mechanics of skin to develop next generation therapies. **J Mech Behav Biomed Mater.**, v.28, p. 471 – 473, 2013.

LIMA, Fabiana Vieira *et al.* Analytical tools for urocanic acid determination in human samples: a review. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 438-447, 3 nov. 2020.

LINARES, I. Borrás *et al.* Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1218, n. 42, p. 7682-7690, out. 2011.

LORIGO, Margarida *et al.* Antioxidants as stabilizers of UV filters: an example for the uv-b filter octylmethoxycinnamate. **Biomedical Dermatology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-9, dez. 2019.

LOZANO, J. A. *et al.* Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations: **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 47. P. 386 – 392, 2009.

LUIS, J.C. *et al.* UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 101, n. 3, p. 1211-1215, jan. 2007.

MASNEC, I. S. *et al.* New option in photoprotection. **Coll. Antropol.** N.34, p. 257 – 262, April 2010.

MOROCHO-JÁCOME, Ana Lucía *et al.* In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 729-737, 29 jul. 2020.

MUÑOZ-MUÑOZ, J. L. *et al.* PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ROSMARINIC ACID. **Journal Of Food Biochemistry**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 396-408, 8 jun. 2012.

NASH, J. Frank *et al.* Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, [S.L.], v. 30, n. 2-3, p. 88-95, 19 fev. 2014.

NICOLAI, Marisa *et al.* Assessment of the Potential Skin Application of *Plectranthus ecklonii* Benth. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 120, 10 jun. 2020.

PARK et. al., Effect of rosmarinic acid on atopic. **Journal of Dermatology**, Original Article Japanese Dermatological Association. 35. P. 768 – 771, 2008

PEREIRA, M. *et al.* Fotoestabilização de protectores solares por incorporação de chás como fase externa. **Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica**, n (12) 1, 107-116, 2015.

PERES, D. A. *et al.* Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 9, 2018.

PERES, Daniela D'almeida *et al.* Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 246-256, 13 out. 2016.

RICCI-JUNIOR, Eduardo *et al.* In vivo and in vitro evaluation of octyl methoxycinnamate liposomes. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], p. 4689, dez. 2013.

ROMANHOLE, Rodrigo Colina *et al.* Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 162, p. 45-49, set. 2016.

ROSADO, Catarina *et al.* Another Reason for Using Caffeine in Dermocosmetics: sunscreen adjuvant. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, 519, 3 maio 2019.

SAMBANDAN, Divya R. *et al.* Sunscreens: an overview and update. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 64, n. 4, p. 748-758, abr. 2011.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M. *et al.* Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 386-392, fev. 2009.

SANDER, Megan *et al.* The efficacy and safety of sunscreen use for the prevention of skin cancer. **Canadian Medical Association Journal**, [S.L.], v. 192, n. 50, p. 1802-1808, 13 dez. 2020.

SARRUF, Fernanda D. *et al.* Influence of Shea (*Butyrospermum parkii*) butter, TiO 2 and ethylhexyl methoxycinnamate on physical parameters and in vitro photoprotective efficacy. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2076-2085, 19 dez. 2019.

SCALIA, Santo *et al.* Incorporation of the sunscreen agent, octyl methoxycinnamate in a cellulosic fabric grafted with β -cyclodextrin. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 308, n. 1-2, p. 155-159, fev. 2006.

SEITÉ, S. *et al.* Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review. **British Journal Of Dermatology**, [S.L.], v. 163, n. 5, p. 903-914, 26 out. 2010.

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.2/3, p.155-164, 1999.

STIEFEL, C. *et al.* Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 2-30, 28 out. 2014.

SVOBODOVÁ, Alena *et al.* Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. **International Journal Of Radiation Biology**, [S.L.], v. 86, n. 12, p. 999-1030, set. 2010.

TANNER, P. R. Sunscreen product formulation. **Dermatol Clin.**, v.24, 53-62, 2006.

TORRES, Angeli E. *et al.* Botanicals for photoprotection. **Plastic And Aesthetic Research**, [S.L.], v. 2020, p. 1-9, 21 out. 2020.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR parts 201 and 310. Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use; Final Rule. Silver Spring, 2011, v. 76, n. 117, 46 p.

VALLEJO, J. J. *et al.* Evaluation of the avobenzone photostability in solvents used in cosmetics formulations. **Vitae**, v. 18, p. 63 – 71, 2011.

VELASCO, M. V. R. *et al.* 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, 2007.

VELASCO, M. V. R. *et al.* **Broad spectrum bioactive sunscreens**, **International journal of pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 50-7, 3 nov. 2008b.

VELASCO, M. V. R. *et al.* 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.

VELASCO, M. V. R. *et al.* Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 1, n. 9, p. 119-130, 2012.

YANG, Jing. *et al.* Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.605-612, jun. 2008. Elsevier BV.

YAROVAYA, Liudmila *et al.* Effect of grape seed extract on skin fibroblasts exposed to UVA light and its photostability in sunscreen formulation. **Journal Of Cosmetic Dermatology**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 1271-1282, 21 set. 2020.