



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO FPS *IN*
VITRO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS
NATURAIS”**

CARLA NUNES DE MELO

Belo Horizonte, 13 de abril de 2015

Carla Nunes de Melo

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO FPS *IN*
VITRO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS
NATURAIS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

(Departamento de Engenharia Mecânica – UFMG)

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre no controle de tudo.

Aos meus pais, Francisco e Arlete, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e por serem os responsáveis por essa conquista.

À minha irmã Natália, que mesmo longe, sempre foi meu exemplo maior e indiscutivelmente, o que quero ser quando crescer.

Aos amigos Dani, Thiago, ALDS e Brubi pelos anos de amizade, risadas e momentos que fizeram essa trajetória mais fácil.

Aos amigos do Miramez, especialmente à Fanny e Vini, pelo apoio, estudos e por me fazerem acreditar que com fé, temos tudo.

Aos meus familiares do Rio e de Recife, que mesmo silenciosamente, sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos amigos da química, Ed e Carol pela amizade de sempre, pelos conselhos e desabaços nas horas de desespero.

Ao Pedro, pelos filmes ruins, momentos bons e por me fazer acreditar que estou no caminho certo.

Ao Best Hely, pelas danças, caronas, risadas e pelos escândalos na porta de casa.

Ao Thales, pelas zoações de sempre e por simplesmente estar ali.

Ao orientador Pinotti, pela oportunidade e confiança depositada.

Às amigas Su, Camila e Maria Emília, pelas grandes ajudas e momentos de descontração no LabBio (e fora dele).

À Cida, por sempre resolver os “pepinos” e pelos conselhos nas horas que precisei.

À Rosana, Betânia e Renata, pela transmissão de conhecimento, experiência e puxões de orelha nos momentos certos.

Ao Marco Gabaldo, pela elaboração da câmara de testes e por sempre ter solução para minhas ideias, por mais loucas que parecessem.

Ao Professor Mautone, pelos empréstimos de equipamentos e por se colocar sempre à disposição para ajudar.

À toda equipe do LAbBio, que de alguma forma contribuiu para realização deste trabalho.

À equipe do LQPN FioCruz, pelo auxílio e empréstimo do speedvac inúmeras vezes.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS	11
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Fotoproteção	20
3.1.1 Radiação solar	20
3.1.2 Filtros solares	22
3.1.3 Filtros Solares Naturais	24
3.1.4 Fator de Proteção Solar	25
3.2.Comprimento de onda crítico (λ_c)	29
3.3 Cromatografia	30
3.4 Espectroscopia UV	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais	35
4.2 Métodos	37
4.2.1 Projeção da câmara de teste	37
4.2.2 Determinação dos parâmetros experimentais.....	40
4.2.3 Determinação do FPS experimental das amostras comerciais e TiO ₂	41
4.2.4 Avaliação da capacidade de proteção frente à radiação UV (180 a 400 nm). 44	

4.2.5 Obtenção dos extratos brutos	44
4.2.6 Purificação dos extratos brutos por Cromatografia em coluna aberta	45
4.2.7 Monitoramento da faixa espectral das frações	47
4.2.8 Preparação das formulações fotoprotetoras vegetais	47
4.2.9 Determinação do comprimento de onda crítico e FPS pelo método de Mansur das frações e extratos brutos.....	47
4.2.10 Determinação da capacidade de proteção das formulações de frações e extratos brutos vegetais por meio da câmara de testes.....	49
4.2.11 Análises estatísticas.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Determinações dos parâmetros experimentais.....	51
5.2 Validação do método com amostras comerciais e formulação de TiO ₂	52
5.2.1 Determinação do FPS experimental das amostras comerciais e TiO ₂	52
5.2.2 Avaliação da capacidade de proteção frente à radiação UV (180 a 400 nm). 55	
5.3 Obtenção e monitoramento da faixa espectral das frações e extratos brutos.....	60
5.4 Preparação das formulações fotoprotetoras vegetais	70
5.4 Determinação do Comprimento de onda crítico e FPS <i>in vitro</i> das frações e extratos brutos.....	71
5.5 Controle de qualidade das formulações para testes	74
5.6 Avaliação da capacidade fotoprotetora dos extratos e frações vegetais	75
5.6.1 Avaliação da proteção contra radiação UV (180 a 400 nm)	75
5.6.2 Avaliação da proteção contra radiação UVB (290 a 320 nm).....	79
6. CONCLUSÕES.....	82
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	84
ANEXO A	92
ANEXO B	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 - Distribuição de energia emitida pelo sol e incidente na Terra.....	20
Figura 3. 2 - Porcentagem de Radiação UV no topo e na superfície terrestre.....	21
Figura 3. 3 - Espectro de absorção de dois filtros orgânicos presentes em formulações fotoprotetoras, a: ácido p – aminobenzóico, absorvendo na região UVB; b: butil metoxi – dibenzoil – metano, absorvendo na região UVA.....	23
Figura 3. 4 - Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor	28
Figura 3. 5– Relação entre porcentagem da radiação UVB bloqueada por absorção e/ou reflexão e FPS obtida por Sayre e colaboradores.	29
Figura 3. 6 - Exemplos de comprimento de onda crítico, a esquerda um espectro de proteção apenas contra radiação UVB e a direita um espectro de ampla absorção.....	30
Figura 3. 7 - Eluição de três frações a partir de um extrato bruto vegetal; a: extrato no topo da coluna; b: início da separação; c: separação completa de uma das frações.....	32
Figura 3. 8 - Processo de excitação	33
Figura 4. 1- Evaporador Rotativo Fistonm 550 para evaporação do solvente nas frações e extratos brutos vegetais.....	36
Figura 4. 2– Espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Go para determinação das medidas de absorção ótica.	36
Figura 4. 3 - Esquema experimental da câmara de testes, constituído por: (1) caixa de ferro preta; (2) fonte de irradiação de 15 W simulando radiação solar; (3) fonte de irradiação de 5 W, UVC; (4) caixa de papel pluma com abertura para inserção da lâmina com as amostras; (5) lâmina para acondicionamento das amostras; (6) sensor do espectrofotômetro; (7) espectrofotômetro; (8) computador para aquisição de dados. ...	38
Figura 4. 4- Espectro de emissão da fonte de luz de 15 W presente na câmara de testes que simula radiação solar.	39
Figura 4. 5- Espectro de emissão da radiação solar, obtido às 12 horas de um dia ensolarado.....	39
Figura 4. 6- Espectro de emissão da fonte de luz de 5 W presente na câmara de testes com emissão UVC.....	40

Figura 4. 7 - Posição dos pontos para determinação da luminosidade na câmara de testes.	41
Figura 4. 8-Vista lateral da distribuição do fotoprotetor na lâmina para testes.....	42
Figura 4. 9 – Esquema simplificado da metodologia para obtenção das frações dos extratos vegetais, desde a obtenção do extrato bruto até as frações purificadas.	46
Figura 5. 1 -Gráfico de dispersão dos valores obtidos na verificação da iluminância dentro da câmara de testes. A linha pontilhada superior indica o valor da média +1 desvio padrão (+1 σ) e a linha inferior, o valor da média -1 desvio (-1 σ) padrão.....	52
Figura 5. 2 - Limites estabelecidos pelas agências regulamentadoras para aceitação de protetores solares: COLIPA:+ 20 % e – 20 % de variação em relação ao FPS fornecido pelo fabricante (linha contínua azul); Limites estabelecidos pela FDA: + 5 % e – 5 % de variação em relação ao FPS fornecido pelo fabricante (linha tracejada vermelha); FPS teórico fornecido pelo fabricante (linha contínua verde).....	54
Figura 5. 3 – Comportamento de protetores comerciais FPS 60 frente a radiação solar em um período de 120 minutos.	55
Figura 5. 4 – Comportamento de protetores comerciais FPS 50 frente a radiação solar em um período 120 minutos	56
Figura 5. 5 – Comportamento de protetores comerciais FPS 30 frente a radiação solar em um período de 120 minutos	57
Figura 5. 6 – Comportamento da formulação de TiO ₂ frente a radiação solar em um período de 120 minutos.	59
Figura 5. 7 - Perfil de absorção da A1 (Grupo 1).	62
Figura 5. 8 - Perfil de absorção das frações A2, A3, A4, A5 e A6 (Grupo 2).....	62
Figura 5. 9 - Perfil de absorção das frações A7 E A8 (Grupo 3).....	63
Figura 5. 10- Perfil de absorção das frações A7 E A8 (Grupo 4).....	63
Figura 5. 11- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie A.....	64
Figura 5. 12- Perfil de absorção da fração B1da espécie B (Grupo1).	65
Figura 5. 13- Perfil de absorção da fração B2 (Grupo 2).	65
Figura 5. 14- Perfil de absorção das frações B3 e B4 (Grupo 3).....	66
Figura 5. 15- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie B.....	66
Figura 5. 16- Perfil de absorção das frações C1, C2 e C3 (Grupo 1).	67
Figura 5. 17- Perfil de absorção da fração C4 (Grupo 2).	68

Figura 5. 18- Perfil de absorção das frações C5 e C6 (Grupo 3).....	68
Figura 5. 19- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie C.....	69
Figura 5. 20- Espectro de absorção do óleo de Rosa Mosqueta	70
Figura 5. 21- Espectro de absorção do óleo mineral	70
Figura 5. 22- Espectro de absorção do gel Natrosol 1% m/m em água.....	71
Figura 5. 23- Espectro da fração A8 com $\lambda_c = 377$ nm.	73
Figura 5. 24- Espectro da fração C3 com $\lambda_c = 340$ nm.....	73
Figura 5. 25– Comportamento frente a radiação UV das frações A7 e A8 e extrato bruto da espécie A no período de 120 minutos.	75
Figura 5. 26– Comportamento frente a radiação UV das frações B1 e B2 e extrato bruto da espécie B no período de 120 minutos.	76
Figura 5. 27– Comportamento frente a radiação UV do extrato bruto da espécie C no período de 120 minutos.	76
Figura 5. 28 - Espectros de transmissão da radiação UV do protetor comercial P6 (a) e da formulação preparada com o extrato bruto da espécie vegetal B (b) nos tempos de 15, 60 e 120 minutos. As figuras mostram que embora a capacidade de bloquear a radiação UV do protetor P6 ser maior, esse perde a mesma capacidade de proteção de forma mais acentuada que a formulação preparada com o extrato bruto da espécie B.	78
Figura 5. 29– Comparação entre os métodos de Mansur e metodologia da câmara de testes e relação de Sayre.	80

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 4. 1- Dados dos filtros solares comerciais utilizados e formulação de TiO_2	44
Tabela 4. 2 - Ordem de eluição e proporção das fases móvel utilizadas.....	45
Tabela 4. 3 - Efeito eritematogênico e intensidade da radiação	49
Tabela 5. 1 – Valores da iluminância em nove pontos da câmara de testes.....	51
Tabela 5. 2– Comparação entre o FPS fornecido pelo fabricante e o FPS experimental por meio da câmara de testes.....	52
Tabela 5. 3 – Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 60.....	56
Tabela 5. 4 – Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 50.....	57
Tabela 5. 5 - Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 30.....	58
Tabela 5. 6 - Quantidade de frações obtidas por cromatografia.....	60
Tabela 5. 7 – Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal A	60
Tabela 5. 8 - Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal B	61
Tabela 5. 9- Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal C	61
Tabela 5. 10- Dados de comprimento de onda crítico e FPS das frações e extratos brutos	72
Tabela 5. 11- pH das formulações com frações e extratos brutos vegetais	74
Tabela 5. 12– Dados de proteção contra radiação UV obtidos para frações e extratos brutos vegetais.	77
Quadro 1 - Tipos de pele e suas características	93
Quadro 2- Lista de filtros solares permitidos no Brasil e suas concentrações máximas.	94

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%AR	Porcentagem de radiação UV absorvida e/ou refletida
λ	Comprimento de onda
λ_c	Comprimento de onda crítico
A1	Fração 1 espécie vegetal A
A10	Fração 10 espécie vegetal A
A2	Fração 2 espécie vegetal A
A3	Fração 3 espécie vegetal A
A4	Fração 4 espécie vegetal A
A5	Fração 5 espécie vegetal A
A6	Fração 6 espécie vegetal A
A7	Fração 7 espécie vegetal A
A8	Fração 8 espécie vegetal A
A9	Fração 9 espécie vegetal A
Abs (λ)	Leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da fração no comprimento de onda (λ)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A_o	Área do espectro de emissão através da lâmina antes da aplicação das amostras
A_t	Área do espectro de transmissão através da lâmina + película da amostra monitorada em intervalos de 15 minutos
B1	Fração 1 espécie vegetal B
B2	Fração 2 espécie vegetal B
B3	Fração 3 espécie vegetal B

B4	Fração 4 espécie vegetal B
BASF	Badische Anilin & Soda Fabrik
C1	Fração 1 espécie vegetal C
C2	Fração 2 espécie vegetal C
C3	Fração 3 espécie vegetal C
C4	Fração 4 espécie vegetal C
C5	Fração 5 espécie vegetal C
C6	Fração 6 espécie vegetal C
COLIPA	Comité de Liason des Associations Européenes de Industrie et de la Perfumere
CPTEC	Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos
CTFA-SA	Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – South Africa
CTFA-USA	Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – United States of America
DIN	Deutches Institut für Normung
DME	Dose Mínima Eritematosa
EE (λ)	Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ
EX A	Extrato Bruto espécie vegetal B
EX B	Extrato Bruto espécie vegetal A
EX C	Extrato Bruto espécie vegetal C
FC	Fator de correção
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de Proteção Solar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Filtro solar inorgânico

I (I)	Intensidade da luz solar no comprimento de onda λ
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ISPF	International Sun Protection Factor Test Method
IV	Infravermelho
JCIA	Japan Cosmetic Industry Association
O	Filtro solar orgânico
P1	FPS 60 Protetor solar comercial 1 com FPS 60
P2	FPS 60 Protetor solar comercial 2 com FPS 60
P3	FPS 60 Protetor solar comercial 3 com FPS 60
P4	FPS 50 Protetor solar comercial 4 com FPS 50
P5	FPS 50 Protetor solar comercial 5 com FPS 50
P6	FPS 50 Protetor solar comercial 6 com FPS 50
P7	FPS 30 Protetor solar comercial 7 com FPS 30
P8	FPS 30 Protetor solar comercial 8 com FPS 30
P9	FPS 30 Protetor solar comercial 9 com FPS 30
PA	Para Análise
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta B
Vis	Visível

RESUMO

A luz solar estimula a produção de vitamina D, ajuda a controlar algumas doenças crônicas da pele e provoca uma sensação de bem-estar. No entanto, pode também causar danos à pele. Os danos não incluem apenas as queimaduras solares, mas os cânceres de pele, rugas e outras mudanças associadas com o envelhecimento da pele. Vários estudos têm sido feitos para investigar a atividade fotoprotetora de extratos vegetais. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações contendo extratos brutos e frações obtidas por cromatografia em coluna de três espécies vegetais do Cerrado brasileiro. Também foi proposto um novo método *in vitro* para avaliar a atividade fotoprotetora de formulações de protetores solares. O método foi validado por meio de testes envolvendo nove formulações fotoprotetoras comerciais autorizados pela ANVISA. O experimento foi realizado em uma câmara de testes feita em aço e pintada na cor preta composta por uma lâmpada simulando a radiação solar, um suporte para acondicionamento da amostra em teste, situado a 15 cm da fonte de irradiação e o sensor para captar a radiação transmitida através da amostra. O método foi baseado em uma relação disponível na literatura e que relaciona o percentual de radiação UV não transmitida e o Fator de Proteção Solar. Por meio desta relação foi possível determinar o Fator de Proteção Solar experimental das amostras. Análises estatísticas mostraram que os resultados do teste estão de acordo com o previsto pelos fabricantes. Depois de validado, o método foi aplicado para avaliar a capacidade de proteção das formulações naturais. Os resultados mostraram que o procedimento pode ser uma boa alternativa para formulações cosméticas, com uma avaliação rápida, sensível e reprodutível da atividade de proteção solar, tanto de formulações comerciais quanto de formulações preparadas a partir de extratos vegetais obtidos a partir de espécies do Cerrado brasileiro.

Palavras-chave: atividade fotoprotetora, extratos vegetais, radiação ultravioleta, metodologia *in vitro*.

ABSTRACT

Sunlight stimulates vitamin D production, helps control some chronic skin diseases and causes a sense of well-being. However, sunlight can also cause damage to skin. Damage includes not only sunburn, but skin cancers, wrinkling and other changes associated with aging skin. Several studies have investigated the photoprotection activity of plant extracts. Thus, the aim of this study was to develop formulations containing crude extracts and fractions obtained by column chromatography of three plant species from Brazilian Cerrado. A new *in vitro* method was proposed to evaluate the sunscreen photoprotective activity of plants extracts against UV radiation. The method was validated by testing nine commercial formulations authorized by ANVISA. The experimental design was composed of a lamp to simulate the solar spectrum, a base containing the tested sample, placed at 15 cm from the solar lamp, and a sensor to capture the radiation transmitted through the sample, all this sealed inside a black iron box. The method was based on a relationship between not transmitted UV radiation percentage and the sun protection factor determined by Sayre and collaborators. Through this relationship, it is possible to determine the SPF of the tested samples. Statistic analysis showed that the test results are in agreement with the prediction by the manufacturers. After validated, the same method was applied to evaluate the photoprotective capacity of natural formulations. The values obtained for natural formulations were then compared with the previously validated method described by Mansour. Results have shown that the procedure can be a good alternative to cosmetic methods with a rapid, sensitive and reproducible evaluation of the sunscreen activity of either commercial formulations or plant extracts.

Keywords: Photoprotective activity, Plant extract, Ultraviolet radiation, *in vitro* methodology.

1. INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta é a parte do espectro eletromagnético referente aos comprimentos de onda entre 100 e 400 nm. De acordo com a intensidade que é absorvida pelo oxigênio e ozônio e, em função dos efeitos fotobiológicos costuma-se dividir em três regiões distintas:

- Os raios UVA (320 – 400 nm) são os mais longos do espectro de ação UV. Sofrem pouca absorção pelo O₃ estratosférico. O excesso de exposição pode causar queimaduras e, em longo prazo, causa envelhecimento precoce (KHURY, 2010).
- A radiação UVB (290 – 320 nm) é fortemente absorvida pelo O₃ estratosférico. Devido sua alta energia, são as responsáveis pelos danos agudos e crônicos à pele, tais como manchas, queimaduras, descamação e câncer de pele. É importante para síntese de vitamina D no organismo. (ARAUJO, 2008).
- Os raios UVC (100 – 290 nm) são os mais energéticos, característica que a torna extremamente lesiva aos seres vivos. Devido à absorção pelo oxigênio e pelo ozônio na estratosfera, nenhuma radiação UVC chega a superfície da Terra. (STREINER, 1995).

A utilização de protetores solares é a principal abordagem cosmética contra os efeitos nocivos da radiação Ultra Violeta. Por isso, o maior desafio a ser atingido pela ciência, é o estabelecimento de métodos confiáveis e reprodutíveis de avaliação de fotoprotetores. A eficácia de um protetor solar está intimamente relacionada com a capacidade de bloqueio da radiação UV por um período de tempo razoável. (PETRAZZUOLI, 2000). Inúmeros testes para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares vêm sendo realizados e, sem dúvida, os testes mais adequados e realistas são aqueles realizados *in vivo*, segundo o Registro Federal dos Estados Unidos de 25 de Agosto de 1978 (43 FR 166). Neste sentido, vários procedimentos clínicos foram desenvolvidos e propostos por organizações particulares ou governamentais tais como a *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos que em 1978, propôs a primeira normatização para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). De maneira geral, todos os testes propostos são conduzidos por especialistas, são de longa duração e envolvem no mínimo 20 pessoas de ambos os sexos, com tipos de pele I, II e III segundo a classificação internacional (ANEXO A). A pele de cada pessoa testada

deve ser integral, sem bronzeamento e não deve ter nenhuma resposta anormal à luz solar induzida por medicamentos, alimentação ou naturalmente (FDA).

A fim de facilitar as determinações e eliminar os riscos para a saúde dos seres humanos, várias técnicas experimentais *in vitro* foram desenvolvidas e têm se mostrado uma alternativa prática para determinação aproximada e de guia para testes finais com seres humanos. Os métodos *in vitro* mais usados e de maior confiabilidade são baseados em técnicas de análises espectrofotométricas envolvendo medidas de transmissão ótica na região UVB. Esses testes são utilizados para protetores com filtros solares orgânicos, pois, apresentam a desvantagem de solubilização de filtros inorgânicos da amostra nos solventes para teste. Além disso, não apresentam uma proposta para determinar a eficiência dos protetores na faixa UVA.

No Brasil, o consumo de moderadores solares vem aumentando a cada ano e os métodos utilizados mostram-se inadequados para um controle rotineiro por parte das indústrias e laboratórios de pesquisa. Nesse contexto, na primeira etapa deste trabalho é sugerida uma técnica para determinação da eficácia de protetores solares, entretanto, utilizando equipamentos óticos mais simples e de baixo custo. A nova metodologia pode ser utilizada para formulações contendo filtros orgânicos e inorgânicos além de fornecer informações sobre o comportamento desses filtros em uma ampla faixa de comprimento de onda do espectro solar.

Outra questão que precisa ser mais investigada é a eficiência das formulações fotoprotetoras. Os filtros ultravioletas são moléculas ou partículas capazes de interagir com a radiação incidente sobre a pele, refletindo ou absorvendo essa radiação e, desta forma, reduzindo sua interação com superfície cutânea. São divididos em dois grupos: filtros orgânicos e filtros inorgânicos. Enquanto os primeiros agem absorvendo a radiação UV, os segundos são partículas capazes de refletir essa radiação. Ambos os filtros podem oferecer proteção à radiação UVA (filtros UVA), à radiação UVB (filtros UVB) ou as duas (filtros de amplo espectro). A eficácia dos filtros orgânicos está diretamente relacionada à estabilidade fotoquímica e com dispersão e dissolução facilitadas e permanentes no veículo utilizado. Estes filtros devem ser atóxicos e não causar irritação ou alergia. Os filtros inorgânicos apresentam elevada fotoestabilidade, ou seja, capacidade de manter a eficácia fotoprotetora após longos períodos de radiação, o que lhe

confere geralmente, maior segurança, e, não reagem com filtros orgânicos. Logo, são considerados atóxicos, estáveis e eleitos como primeira escolha para fotoprotetores destinados a pacientes com histórico de alergia. Por outro lado, apresentam alguns inconvenientes, principalmente em relação a sua cosmética, como: desenvolvimento de coloração opaca, esbranquiçada sobre a pele e geração de radicais livres. Os filtros orgânicos por sua vez, apresentam a desvantagem de serem altamente alergênicos e foto instáveis.

Por isso, torna-se cada vez mais necessário a pesquisa de filtros solares que apresentem ao mesmo tempo, estabilidade, eficiência e baixo potencial alergênico. Por isso, tem-se buscado exemplos na natureza. As espécies vegetais brasileiras, principalmente aquelas que vivem em regiões de temperaturas mais elevadas, têm desenvolvido ao longo do tempo, mecanismo para se protegerem contra os raios ultravioletas. Dessa forma, um grande número de moléculas com capacidade antioxidante pode ser encontrado em espécies vegetais (PESSUTO et al. 2009). Essas moléculas apresentam grupos cromóforos, semelhantes aos filtros orgânicos sintéticos, com a vantagem de serem mais estáveis frente à radiação UV e atenderem a um grupo crescente de consumidores que optam por produtos de origem natural. Assim sendo, este trabalho visa ainda, a preparação de formulações fotoprotetoras preparadas com extratos vegetais de espécies oriundas do Cerrado brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método de avaliação da capacidade de proteção de formulações fotoprotetoras comerciais e de extratos vegetais de espécies do cerrado brasileiro.

2.2 Objetivos específicos

Primeira etapa

- Projetar e desenvolver uma câmara de testes para avaliação da capacidade proteção perante a radiação UV de protetores solares comerciais.
- Desenvolver e validar um método para determinação do FPS, *in vitro*, de protetores solares comerciais.
- Avaliar a capacidade de proteção contra a radiação UV ao longo do tempo de amostras fotoprotetoras comerciais.

Segunda etapa

- Obter a partir de técnicas cromatográficas frações de espécies vegetais de interesse.
- Analisar o espectro de absorção das frações e extratos brutos obtidos verificando sua correspondência às faixas de UVA (320 – 400 nm), UVB (290 – 320 nm) e UVC (200 – 290 nm).
- Determinar o FPS, *in vitro*, pelo método de Mansur e o comprimento de onda crítico das frações e extratos brutos obtidos.
- Determinar o FPS, *in vitro*, das formulações vegetais por meio da metodologia validada.

- Avaliar a capacidade de proteção contra a radiação UV ao longo do tempo das formulações vegetais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fotoproteção

3.1.1 Radiação solar

O Sol emite energia em praticamente todos os comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Quase metade desta energia (44%) concentra-se na faixa entre 400 e 700 nm (espectro visível), como mostrado na FIG.3.1. O restante é dividido entre radiação ultravioleta (abaixo de 400 nm) com 7%, infravermelho próximo (entre 700 e 1500 nm) com 37% e infravermelho (acima de 1500 nm) com 11%. Menos de 1% da radiação emitida concentra-se acima da região do infravermelho, ou seja, micro ondas e ondas de rádio, e abaixo da região ultravioleta, como raios X e raios gama.

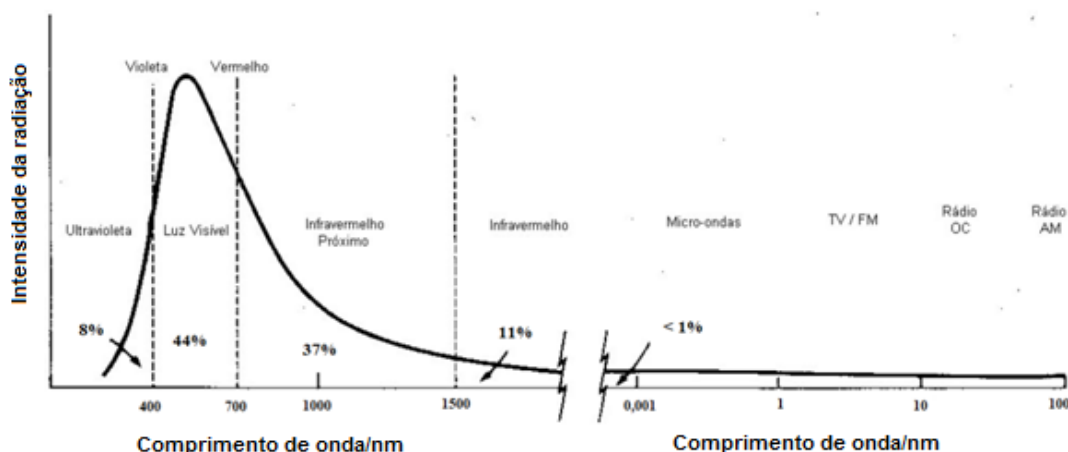


Figura 3. 1 - Distribuição de energia emitida pelo sol e incidente na Terra

(Fonte: CPTEC/INPE)

Nosso organismo percebe a presença da radiação solar de diferentes formas. A radiação infravermelha (IV) é percebida sob a forma de calor, a radiação visível (Vis)

através das diferentes cores detectadas pelo sistema óptico e a radiação ultravioleta (UV) através de reações fotoquímicas.

A energia de um determinado comprimento de onda do espectro eletromagnético aumenta com a redução do comprimento de onda, assim, da radiação solar incidente na Terra, a faixa do UV é a de menor comprimento de onda e, conseqüentemente, a mais energética, e mais propensa a induzir reações fotoquímicas (OSTEWALDER, 2000). Essas reações fotoquímicas têm efeitos sobre a pele que podem ser classificados como efeitos agudos (imediatos) ou crônicos (em longo prazo). Os efeitos agudos, como queimaduras, bronzeamento e produção de vitamina D, desenvolvem-se e desaparecem rapidamente; enquanto que os crônicos, como foto envelhecimento e câncer de pele, têm aparecimento gradual e de longa duração. A diferença entre ambas as reações se deve, principalmente, ao histórico de exposição da pessoa e a diferentes comprimentos de onda da radiação UV.

Dentre as três faixas de comprimento de onda que abrangem a região UV, a radiação UVA é a mais abundante na superfície terrestre, em contrapartida, a radiação UVC é totalmente absorvida. A FIG.3.2 compara a porcentagem de radiação UV no topo da atmosfera com a porcentagem incidida sobre a superfície da Terra.

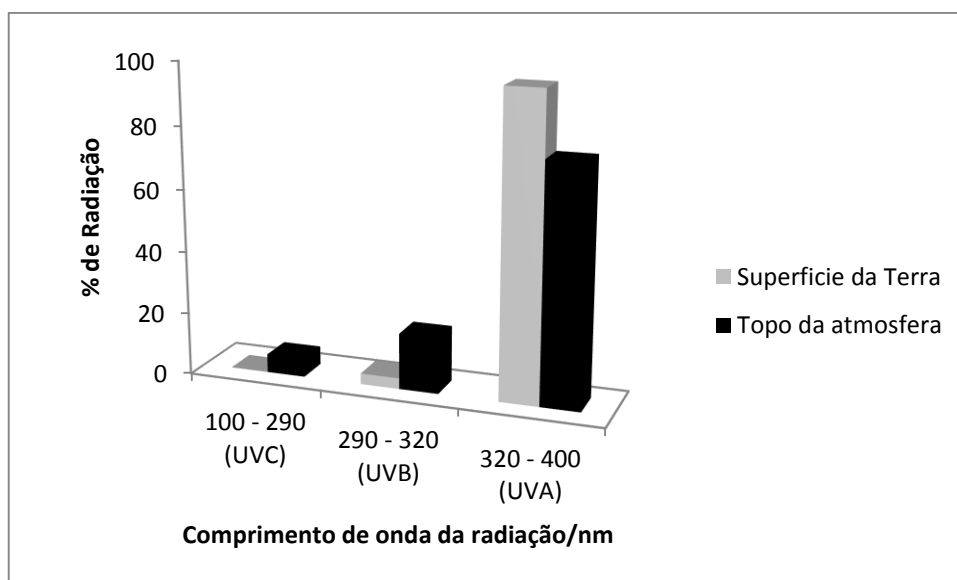


Figura 3. 2 - Porcentagem de Radiação UV no topo e na superfície terrestre

(Fonte: ANVISA)

3.1.2 Filtros solares

Os efeitos prejudiciais causados à pele pela radiação UV podem ser minimizados pelo uso de protetores solares. Protetores solares são preparações cosméticas que possuem formas de apresentação diversas. Podem ser encontrados na forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água, bastões, aerossóis, entre outras. Segundo a ANVISA, protetor solar é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação. São denominados orgânicos e inorgânicos respectivamente, de acordo com a sua capacidade de absorção ou reflexão da radiação (FORESTIER, 2008).

Os filtros inorgânicos, representados principalmente pelo dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO), são responsáveis por refletir a radiação emitida a partir de diferentes comprimentos de onda na região do UV. Estes filtros foram previamente classificados como partículas inertes e incapazes de sofrerem absorção percutânea. Sendo assim, alguns autores defendem que os filtros solares inorgânicos representam uma das melhores e mais efetivas estratégias para proteger a pele, devido ao seu baixo potencial de irritabilidade, e recomendam seu uso para as crianças e pessoas com pele sensível (PALM; O'DONOGHUE, 2007).

Em contrapartida, evidências recentes demonstraram que partículas desses óxidos em tamanho reduzido ($< 100 \text{ nm}$) podem ser absorvidas através da pele, transportadas aos demais órgãos e causar danos aos rins, fígado, pulmões, baço e outros tecidos. Além disso, as partículas de TiO_2 e ZnO na presença da luz UV são ativados a produzir radicais livres que promovem o envelhecimento precoce, desidratação e diminuição da elasticidade da pele. As principais espécies reativas formadas são os radicais hidroxilas, ânions superóxidos e oxigênio singletes (NAKAGAWA et al., 1997).

A fim de minimizar os efeitos deletérios à pele, as partículas dos óxidos em alguns protetores solares, são revestidas com matérias inertes, como silicones, possivelmente para diminuir os danos causados pela formação de radicais livres e interação com outros componentes da formulação.

Os filtros orgânicos são constituídos por moléculas capazes de absorver a radiação UV e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). A estrutura molecular responsável pela absorção da radiação UV é chamada de cromóforo. O cromóforo apresenta grande quantidade de ligações duplas conjugadas em sua estrutura, uma mínima alteração nessa quantidade de ligações duplas pode alterar significativamente o comprimento de onda e a intensidade de absorção do cromóforo. A FIG. 3.3 ilustra alguns exemplos de filtros orgânicos presentes em formulações fotoprotetoras. Mais exemplos estão disponíveis no ANEXO B.

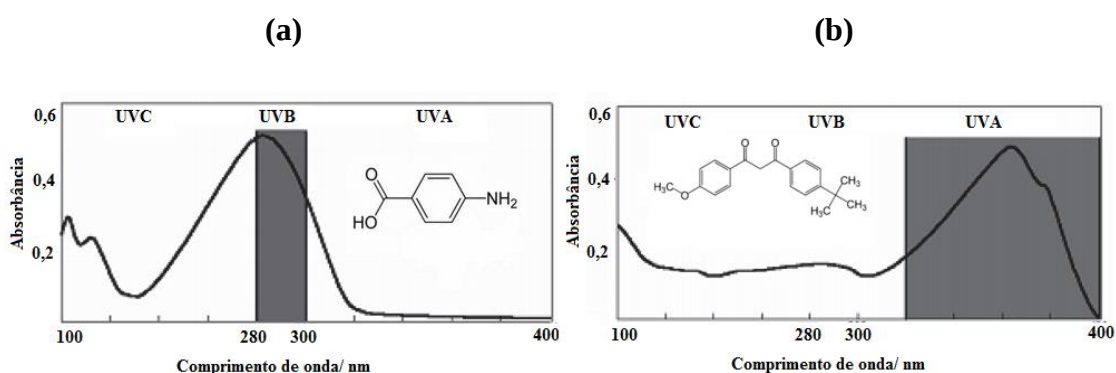


Figura 3. 3 - Espectro de absorção de dois filtros orgânicos presentes em formulações fotoprotetoras, a: ácido p – aminobenzoico, absorvendo na região UVB; b: butil metoxi – dibenzoil – metano, absorvendo na região UVA.

(Fonte: Cosmet. Toil., 1995, 7,47)

Um fóton de radiação UV absorvido por uma substância tem energia suficiente para causar a transferência de elétrons de um orbital de menor para energia para um de maior energia. Neste caso, tal substância funcionando como um filtro UV passa do estado fundamental (baixa energia) para um estado excitado (alta energia). A partir do estado excitado, diferentes tipos de reações podem ocorrer, dependendo da habilidade do filtro em converter a energia absorvida. O que se espera de um bom filtro é que possa simplesmente retornar ao estado fundamental liberando energia na forma de calor e, dessa forma recupera sua habilidade em absorver radiação UV repetidas vezes. Tal propriedade caracteriza um filtro estável. Por outro lado, na eventualidade de ocorrer uma transformação estrutural ou degradação, o filtro perde sua capacidade de absorção de UV e conseqüentemente seu poder de proteção. Neste caso, o filtro caracteriza-se por ser foto-instável. Os filtros podem ser também foto-reativos. A molécula excitada pode

interagir com outros componentes do filtro solar, oxigênio do ambiente ou biomoléculas da pele (proteínas, lipídeos) e então, conduzir a produção de espécies reativas, os radicais livres.

Os filtros orgânicos são classificados em filtros UVA ou filtros UVB de acordo com a sua capacidade de absorver radiação UV. Filtros UVB são aqueles capazes de absorver radiação entre 290 a 320 nm e os filtros UVA entre 320 e 400 nm. Em formulações recentes, os filtros têm sido utilizados em associação, pois nenhum deles isoladamente, na concentração recomendada pela FDA (*Food and drug Administration*), proporciona fator de proteção adequado ou largo espectro de absorção (SERPONE, et al., 2007).

3.1.3 Filtros Solares Naturais

Muito se tem estudado a fim de se intensificar a capacidade fotoprotetora de preparações de filtros solares, com esse intuito buscou-se exemplo na natureza. Com resultado da seleção natural, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção contra a radiação UV, como a produção de altos níveis de antioxidantes e a síntese de compostos capazes de absorver a radiação UV. Esses compostos são representados pelos polifênóis, que são os metabólitos secundários das plantas com uma diversidade estrutural notável, pois compreendem mais de 8000 moléculas naturais. Neste grupo estão os flavonoides, antioxidantes potentes, capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, além da capacidade de absorção da radiação UV (SVOBODOVÁ, et al., 2003).

O uso de produtos naturais como bloqueadores solares, foi descrito inicialmente por Proserpio (1976), em que este faz uma analogia entre as estruturas moleculares das substâncias ativas presentes em algumas plantas com as estruturas bases de alguns dos principais filtros solares sintéticos. A partir daí, alguns estudos veem sendo feitos sobre a capacidade fotoprotetora de extratos vegetais.

Alvarez e Rodrigues (2000) fizeram um estudo acerca da capacidade fotoprotetora de extratos de café verde (não torrado) e mais tarde, Savian e colaboradores (2011) propuseram uma formulação contendo extrato de café verde como potencializador da atividade fotoprotetora de filtros solares comerciais.

A avaliação da atividade fotoprotetora de formulações contendo extrato de própolis verde e vermelha foi feita por Nascimento e colaboradores (2009). Foi avaliada *in vitro* a capacidade do incremento na atividade fotoprotetora em formulação comercial, utilizando etanol e propilenoglicol como solventes para extração. Os resultados mostraram que os extratos analisados apresentaram atividade fotoprotetora e sua incorporação às formulações fotoprotetoras leva a uma intensificação do fator de proteção solar.

Violante e colaboradores (2011) apresentaram resultados satisfatórios quanto ao potencial fotoprotetor de extratos vegetais do cerrado do Mato Grosso. As leituras espectrofotométricas dos extratos brutos em etanol foram analisadas e intensa absorção foi observada na região UV do espectro eletromagnético.

Dentre os biomas brasileiros, acredita-se que o Cerrado seja o tipo de savana mais rico em biodiversidade do planeta, com mais de 3000 espécies vegetais endêmicas. Sendo que, cerca de 1000 delas são do estrato arbóreo-arbustivo e 2000, do estrato herbáceo-subarbustivo. Como famílias de maior expressão destacam-se as leguminosas *Mimosaceae*, *Fabaceae* e *Caesalpiniceae*. A presença de muitos compostos secundários e metabólitos presentes nas plantas dessa família, têm grande importância econômica, permitindo que compostos produzidos pelas leguminosas sejam utilizados na fabricação de gomas, corantes, espessantes, medicamentos, resinas e pesticidas (LEWIS, 2005). Devido à intensa radiação solar e temperaturas elevadas desse bioma, as espécies vegetais do cerrado apresentam mecanismos de defesa eficiente para proteção de suas células. Por isso, torna-se cada vez mais necessário ampliar as informações acerca dessa vegetação. Em um estudo feito por Oliveira e colaboradores em 2009, foram encontradas, nas células fotossintetizantes de uma espécie vegetal da família *Fabaceae*, concentrações relativamente elevadas de moléculas capazes de minimizar os efeitos dos EROs ocasionados por exposição intensa à radiação solar. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha e colaboradores em 2007, para a espécie do gênero *Bauhinia*, *Caesalpiniceae*.

3.1.4 Fator de Proteção Solar

Em 1934, Friedrich Ellinger relatou o primeiro estudo sobre avaliação da eficácia protetora de protetores solares, onde o autor realizava a determinação da Dose

Eritematosa Mínima (DME) na pele protegida e não protegida e, dessa forma, propunha um coeficiente de proteção que decrescia em valor à medida que a proteção aumentava (HENNEW, 1983).

Rudolf Schulze em 1956 propôs a avaliação de fotoprotetores comercialmente disponíveis calculando o fator de proteção dividindo o tempo de exposição necessário para a indução de eritema com o protetor pelo tempo necessário para indução de eritema com o protetor para a indução de eritema sem o protetor, utilizando doses de radiação progressivas emitidas por lâmpadas com espectro de radiação mais próximo da luz solar (WEEL, et. al., 1998).

Em meados da década de 70, o termo Fator de Proteção Solar (FPS) foi introduzido (GREITER, 1974). O FPS proposto por Greiter se tornou popular e utilizado em todo o mundo. Entretanto, pela falta de padronização do método, os valores numéricos encontrados e utilizados nos fotoprotetores apresentavam grande variação, não conferindo confiabilidade ao método (HENNEW, 1983).

Em 1978, a agência regulatória Norte-America FDA (*Food and Drug Administration*) propôs a primeira normatização para a determinação do Fator de Proteção Solar. O Fator de Proteção Solar pode ser definido como sendo a razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima da pele protegida pelo fotoprotetor em questão, aplicado na quantidade de 2 mg/cm², e a Dose Eritematosa Mínima da pele não protegida, numa relação matemática que pode ser apresentada conforme Equação 3.1.

$$FPS = \frac{DEM \text{ (pele protegida)}}{DEM \text{ (pele não protegida)}} \quad 3.1$$

Para a determinação do valor do FPS, um grupo de 10 a 20 voluntários de diferentes foto tipos são selecionados e submetidos a doses progressivas de radiação ultravioleta emitidas por uma fonte artificial de luz, denominada simulador solar, em áreas de pele não protegida e pele protegida pelo protetor solar em estudo, aplicado na quantidade de 2 mg/cm². Após certo período de exposição, é realizada a leitura da Dose Eritematosa Mínima nas duas áreas e calculada a sua razão. A média dos valores encontrados no grupo de voluntários é o Fator de Proteção Solar do produto.

Além da normatização proposta pela FDA, outras agências reguladoras propõem métodos para determinação do FPS *in vivo*. A *Deutsches Institut für Normung* (DIN), agência Alemã, apresentou em 1984 uma nova metodologia (Norma DIN 67501). As duas metodologias diferem-se basicamente quanto à fonte emissora de UV, lâmpada de Xenônio para FDA e luz natural ou mercúrio para Norma DIN.

A Comunidade Europeia, através da Associação Européia da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria (*Comité de Liason des Associations Européennes de Industrie et de la Parfumerie* – COLIPA), desenvolveu sua primeira metodologia em 1994 e, em 2006 juntamente com a associação Japonesa (JCIA), Sul Africana (CTFA-AS) e norte-americana (CTFA-USA) foi apresentado um método denominado *International Sun Protection Factor Test Method* (ISPF).

As metodologias da FDA e da COLIPA se tornaram referência para diferentes países dentre eles o Brasil, que por meio da resolução RDC Nº 30, editada pela ANVISA em 2012, determina que uma dessas metodologias seja utilizada para a determinação do Fator de Proteção Solar.

Foras as metodologias *in vivo*, as metodologias *in vitro* também podem ser úteis para determinação do FPS. Embora nenhuma metodologia *in vitro* seja indicada como padrão pelas agências regulamentadoras internacionais e nacionais, ela é capaz de fornecer informações prévias acerca de formulações fotoprotetoras em estágios iniciais de desenvolvimento.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens, como a rapidez de execução, o custo acessível, a reprodutibilidade e a não exposição do voluntário ao risco. (SAYRE et al., 2008). O método de Transmitância difusa e Geometria Óptica é geralmente aplicado sobre filtros inorgânicos como óxido de zinco e dióxido de titânio por se tratarem de sistemas opacos. A intensidade de luz incidida sobre os fotoprotetores se dá conforme uma distribuição hemisférica apresentada na FIG. 3.4, a intensidade de radiação é maior na proximidade da incidência para a direção regular transmitida (direção hemisférica). A transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração que coleta a luz dispersada em todos os ângulos. A lâmpada de xenônio com energia suficiente para o intervalo espectral de 250 a 450 nm é usada no interior da esfera integradora. A amostra é aplicada em substratos (simuladores alternativos da pele humana) sob a forma de camada de 2 mg/cm² ou 2 µL/cm² (MOYAL, 2008).

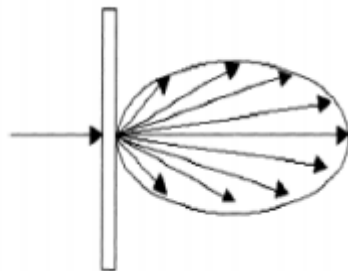


Figura 3. 4 - Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor

(Fonte: SPRINGSTEEN et al., 1999).

A determinação do FPS *in vitro* de filtros orgânicos pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas. Para essa técnica, são utilizados os solventes (e brancos de leitura) metanol, isopropanol ou etanol. Esse método não pode ser empregado para a avaliação de fotoprotetores contendo filtros inorgânicos em função da insolubilidade destes nos solventes comumente utilizados. O cálculo do FPS é obtido por meio de uma equação que leva em consideração a leitura espectrofotométrica da amostra, intensidade da luz solar no comprimento de onda analisado entre outros parâmetros.

No trabalho de Santos et al., (1999) foi realizado um estudo comparativo entre os valores, obtidos pelo Método de Mansur (*in vitro*) e por metodologia *in vivo*, os métodos correlacionaram-se entre si apresentando um erro de no máximo 8% entre as metodologias.

No final da década de 80, Sayre e colaboradores desenvolveram um método *in vitro* que relaciona a porcentagem não transmitida através de um substrato contendo o protetor solar com o valor do FPS (FIG.3.5). Essa relação é ainda muito utilizada e serve como base para pesquisas iniciais de fotoproteção.

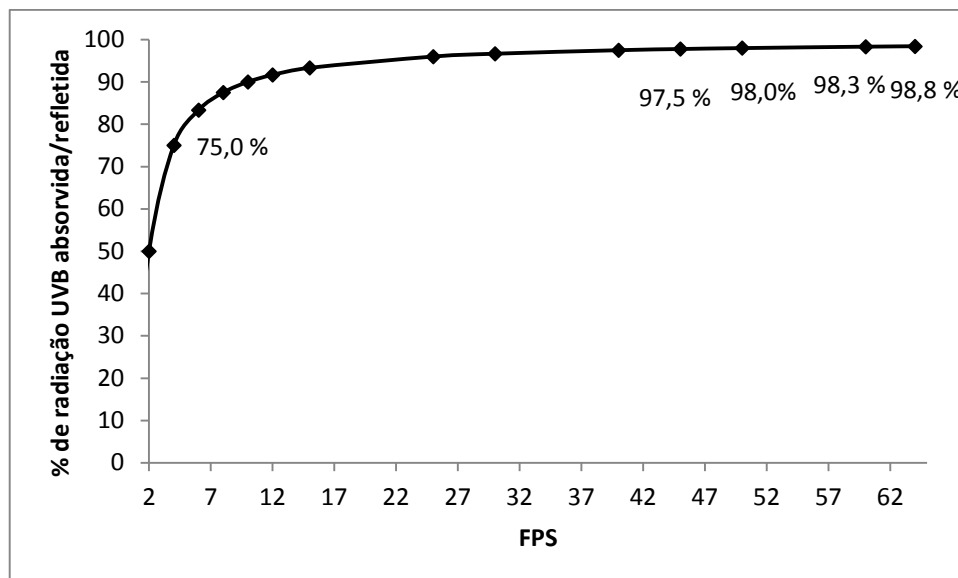


Figura 3. 5– Relação entre porcentagem da radiação UVB bloqueada por absorção e/ou reflexão e FPS obtida por Sayre e colaboradores.

(Fonte: Sayre, 1979).

Apesar do método de Sayre ser eficiente, os equipamentos ópticos utilizados são complexos e de alto custo. Portanto, faz-se necessário a cada dia o desenvolvimento de metodologias *in vitro* de baixo custo, porém com a precisão e eficiência adequadas.

3.2.Comprimento de onda crítico (λ_c)

De uma maneira geral, a eficácia dos filtros solares tem sido associada ao FPS, que quantifica a proteção contra a radiação UVB, porém o papel do UVA na foto carcinogêne e foto envelhecimento vem sendo cada vez mais valorizado. Portanto, torna-se necessário o uso de produtos com amplo espectro de absorção UV. Existem vários métodos para determinação da proteção UVA, no entanto a ANVISA exige que a determinação seja feita pelo método *in vivo* estipulado pela Comissão Européia em 2006 ou pelo método *in vitro* desenvolvido pela COLIPA. Esse último leva em consideração o comprimento de onda crítico do espectro de absorção dos filtros fotoprotetores. O comprimento de onda crítico tem como definição o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica que começa em 290 nanômetros é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nanômetros. O valor do comprimento de onda crítico é baseado na forma da curva de absorção e, portanto, não depende da amplitude da curva, ao contrário do FPS. Dessa forma, as duas técnicas são independentes e

complementares, que juntas fornecem informações completas acerca da eficácia de filtros solares. Na Resolução RDC N° 30 de 2012 a ANVISA determina que filtros solares denominados de amplo espectro de absorção possuam λ_c maior ou igual a 370 nm. Exemplos da determinação do comprimento de onda crítico estão ilustrados na FIG. 3.6.

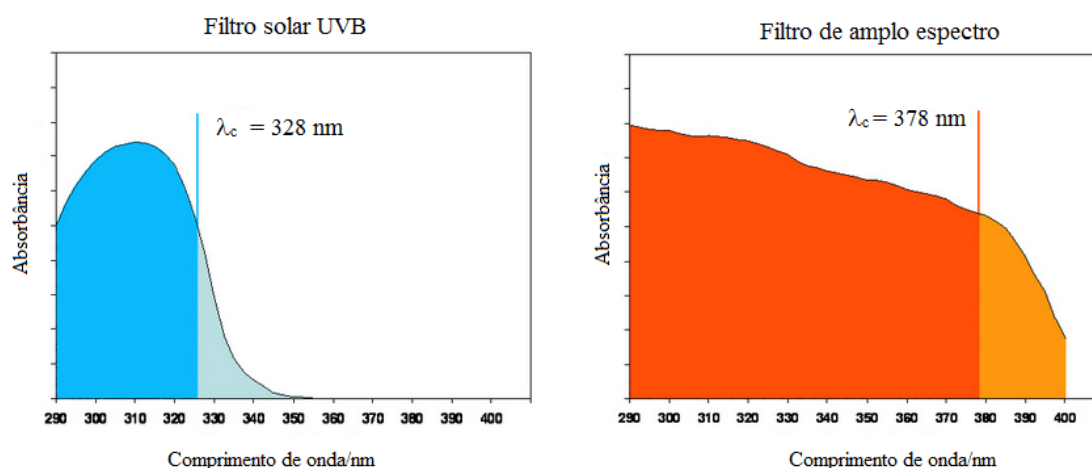


Figura 3. 6 - Exemplos de comprimento de onda crítico, a esquerda um espectro de proteção apenas contra radiação UVB e a direita um espectro de ampla absorção.

(Fonte: adaptado de MOYAL, 2000)

3.3 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato. Uma das fases é estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migração diferencial desses componentes (COLLINS, et al, 2006).

Existem várias técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, entre as mais sofisticadas estão o HPLC, ou cromatografia líquida de alta desempenho (do inglês, *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia à gás que é assim denominada por ser a fase móvel um gás inerte. As técnicas mais simples incluem

cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna à pressão atmosférica.

De uma maneira geral, a coluna cromatográfica é constituída por um tubo de vidro, em posição vertical; a extremidade superior é aberta e a inferior afilada, terminando numa torneira, que permitirá o controle da vazão da fase móvel. As dimensões da coluna dependerão da quantidade de material a ser cromatografado. A fase estacionária da coluna (também chamada de recheio) é o material adsorvente em que os componentes ficaram retidos durante a passagem da fase móvel. Os adsorventes mais comuns empregados em cromatografia são a sílica e a alumina, mas também são utilizados óxido de magnésio, carvão, polímeros de estireno (SNYDER, et.al., 2009). A função das fases móveis (ou eluente) na cromatografia em coluna é promover o desenvolvimento dos componentes da mistura na coluna e remover ou dessorver esses componentes do adsorvente seletivamente.

A cromatografia em coluna à pressão atmosférica tem sido amplamente utilizada para fracionamento de extratos vegetais por ser uma técnica relativamente simples, não exigindo instrumentação sofisticada. Extratos vegetais são misturas complexas de compostos químicos com diferentes grupos funcionais, a cromatografia em coluna por sua vez, tem como objetivo simplificar esse extrato, separando esses compostos em frações mais simples onde os compostos com características semelhantes migram juntamente através da coluna. A FIG. 3.7 ilustra o processo de eluição de três frações por meio de uma coluna cromatográfica.

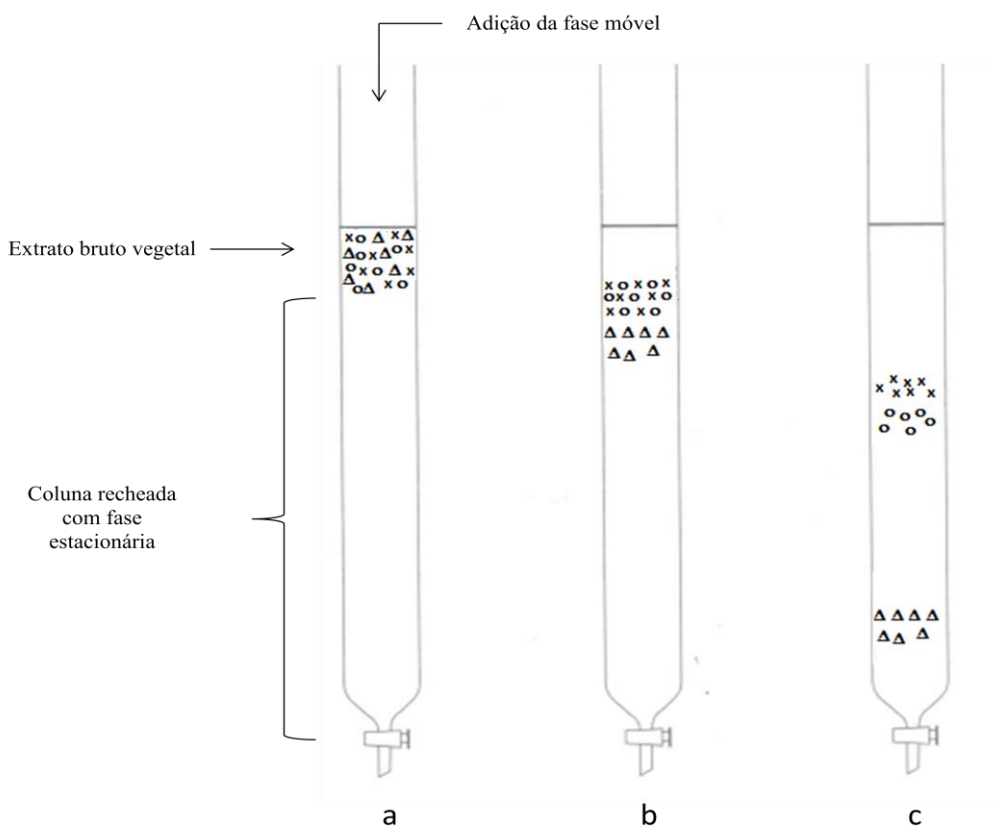


Figura 3. 7 - Eluição de três frações a partir de um extrato bruto vegetal; a: extrato no topo da coluna; b: início da separação; c: separação completa de uma das frações.

(Fonte: Adaptado de COLLINS, 2006).

As frações que são recolhidas pela torneira da coluna passam por um processo de evaporação do solvente, que pode ser feito, utilizando um evaporador rotativo. Quanto maior o número de frações recolhidas, melhor o processo de separação, ou seja, mais purificadas as frações estarão.

Normalmente a cromatografia em coluna não tem como finalidade isolar compostos químicos, trata-se apenas de uma separação preliminar dos constituintes da espécie vegetal em estudo. Para isolamento e elucidação da estrutura química dos compostos presentes no extrato vegetal são necessárias técnicas mais elaboradas como o HPLC acoplado a um espectrômetro de massas, por exemplo.

3.4 Espectroscopia UV

Quando uma radiação continua passa através de um material transparente, uma parte da radiação pode ser absorvida formando um espectro de absorção. Como resultado da energia absorvida, átomos ou moléculas passam de um estado de baixa energia (estado fundamental) para um estado de alta energia (estado excitado). A FIG.3.8 retrata o processo de excitação, que é um processo quantizado. A radiação eletromagnética que é absorvida tem energia exatamente igual à diferença entre o estado excitado e o estado fundamental.

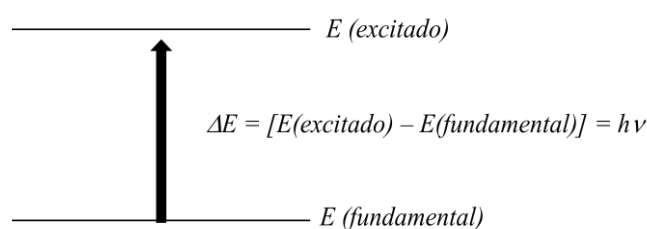


Figura 3. 8 - Processo de excitação

(Fonte: Pavia, 1996)

A absorção da região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada. Nos compostos orgânicos, os que possuem dupla ligação absorvem fortemente em comprimentos de onda mais baixos. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível.

Um espectrofotômetro típico de UV consiste em uma fonte de luz, um monocromador e um detector. A fonte de luz é geralmente uma lâmpada de deutério, que emite radiação eletromagnética na região UV do espectro. Os monocromadores são dispositivos essenciais dos espectrofotômetros e tem como função a seleção do comprimento de onda e que se tem interesse para a análise. É constituído de uma fenda de entrada de um elemento de dispersão de radiação e de uma fenda de saída. O

elemento de dispersão pode ser um prisma ou uma rede de difração. O detector é geralmente um tubo fotomultiplicador, embora em instrumentos modernos fotodiodos são também utilizados. Em um instrumento típico de feixe duplo, a luz emitida pela fonte de luz é dividida em dois feixes, o feixe da amostra e o feixe de referência. Quando não houver nenhuma célula de amostra no feixe de referência, a luz detectada é considerada como sendo igual à intensidade de luz que entra na amostra (PAVIA, 1996).

Espectrofotômetros mais modernos como os de arranjos de diodos, consistem em uma série de detectores de fotodiodos posicionados lado a lado em um cristal de silicone. Cada diodo é concebido para gravar uma banda estreita do espectro. Os diodos são conectados de modo que o espectro inteiro é determinado de uma só vez.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Nove protetores solares, disponíveis comercialmente e autorizados pela ANVISA, foram utilizados para a validação da metodologia na câmara de testes. Os produtos foram adquiridos no comércio local de Belo Horizonte e a identidade dos mesmos será preservada. O dióxido de titânio utilizado também para a validação do método foi o Dióxido de titânio Ti-Pure® R-706 da DuPont.

As características das três espécies vegetais oriundas do Cerrado brasileiro, utilizadas nesse trabalho, estão dispostas na Tabela 3.1. A identidade das mesmas também foi preservada.

3. 1 - Dados das espécies vegetais utilizadas

Espécie Vegetal	Família	Parte de interesse	Período de coleta
A	<i>Fabaceae - Caesalpinioideae</i>	Flores	Fevereiro
B	<i>Aloeaceae</i>	Seiva e folhas	Ano todo
C	<i>Fabaceae</i>	Casca	Junho

As frações das espécies vegetais foram obtidas por meio de colunas cromatográficas de vidro de diâmetros e alturas escolhidos de acordo com a quantidade de material a ser cromatografado. Foi utilizada como fase estacionária sílica Gel 60 adquirida da Macherey-Nagel com granulometria 70-230 mesh. A eluição foi realizada com solventes orgânicos adquiridos da Synth e Vetec. Os solventes utilizados estão descritos posteriormente no item 4.2.6. Os extratos brutos e as frações purificadas foram concentrados em evaporador rotativo Fistom - 550 (FIG. 4.1) com controle de temperatura e pesados em balança analítica de precisão (leitura mínima 0,0001 g), Marte - AY220.



Figura 4. 1- Evaporador Rotativo Fistonm 550 para evaporação do solvente nas frações e extratos brutos vegetais.

(FONTE: LABBIO)

As medidas de absorção ótica das frações e extratos brutos para obtenção dos espectros preliminares, FPS pelo método de Mansur e comprimento de onda crítico foram efetuadas no espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan GO com lâmpada de Xenônio, utilizando-se uma placa de 96 poços de quartzo. Os espectros foram monitorados na faixa de 200–500 nm (FIG. 4.2).



Figura 4. 2– Espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan Go para determinação das medidas de absorção ótica.

(FONTE: LABBIO)

A câmara de testes projetada para os testes possui duas fontes de luz. A primeira, uma lâmpada fluorescente Repti Glo 10.0, 15 W, simulando a radiação solar e a segunda, uma lâmpada UVC TUV PL-S da Philips de 5 W. O Luxímetro e o espectrofotômetro utilizados para as medidas de iluminância e obtenção dos espectros de emissão na câmara de testes foram respectivamente o Digital Lux Meter da Minipa, modelo MLM – 1011 e o EstellarNet UVN SR-200.

4.2 Métodos

A parte experimental do presente trabalho foi dividida em duas etapas, a primeira delas envolveu a projeção, características da câmara de testes e validação da nova metodologia, com amostras fotoprotetoras comerciais. A segunda consistiu na obtenção e preparação de formulações fotoprotetoras naturais utilizando a metodologia então validada.

Primeira etapa

4.2.1 Projeção da câmara de teste

A câmara de testes foi construída em aço, pintada de preto, possui 500 mm de comprimento, 205 mm de largura e 205 mm de altura. A cor preta foi escolhida devido à capacidade de eliminar interferências de ondas eletromagnéticas externas à câmara de testes. A FIG.4.3 ilustra o esquema experimental para a realização dos testes.

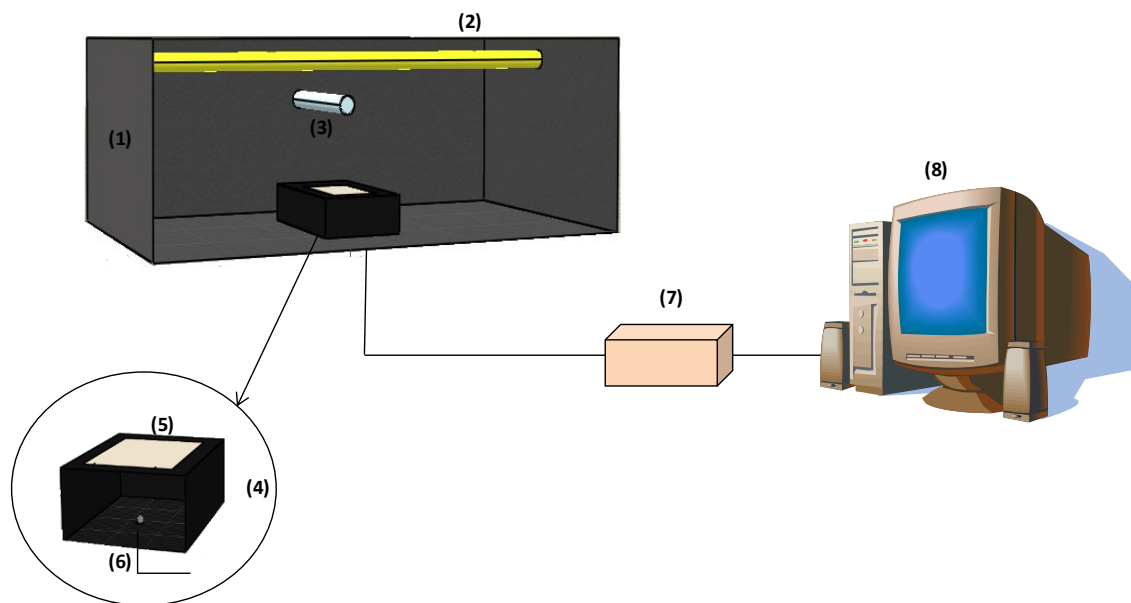


Figura 4. 3 - Esquema experimental da câmara de testes, constituído por: (1) caixa de ferro preta; (2) fonte de irradiação de 15 W simulando radiação solar; (3) fonte de irradiação de 5 W, UVC; (4) caixa de papel pluma com abertura para inserção da lâmina com as amostras; (5) lâmina para acondicionamento das amostras; (6) sensor do espectrofotômetro; (7) espectrofotômetro; (8) computador para aquisição de dados.

A câmara é composta por duas fontes de irradiação: a primeira, que simula a radiação solar (Repti Glo 10.0 Exoterra Répteis, 15 W), foi situada a 15 cm da amostra a ser irradiada; a segunda fonte de irradiação, uma lâmpada UVC (TUV PL-S Philips, 5 W) situada a 12 cm da amostra a ser irradiada. As FIGURA 4.4 ilustra o espectro de emissão da fonte de luz simulando a radiação solar, obtido com o espectrofotômetro EstellarNet UVN SR-200. O espectro de emissão solar na superfície da Terra, obtido as 12 horas de um dia ensolarado, para ilustrar a concordância entre os espectros, também foi obtido e encontra-se ilustrado na FIG. 4.5. O espectro da fonte de radiação UVC também foi obtido utilizando o mesmo espectrofotômetro e está ilustrado na FIG.4.6.

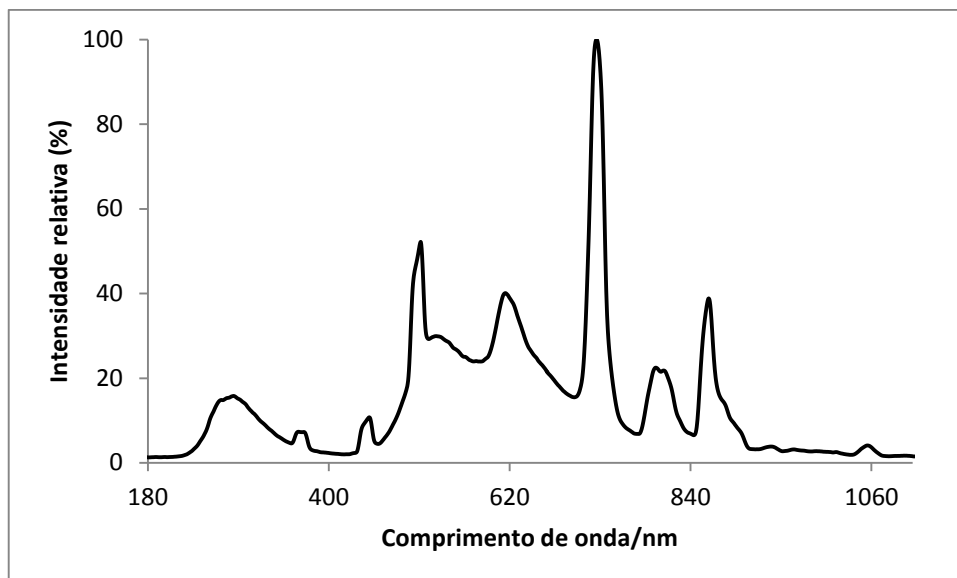


Figura 4. 4- Espectro de emissão da fonte de luz de 15 W presente na câmara de testes que simula radiação solar.

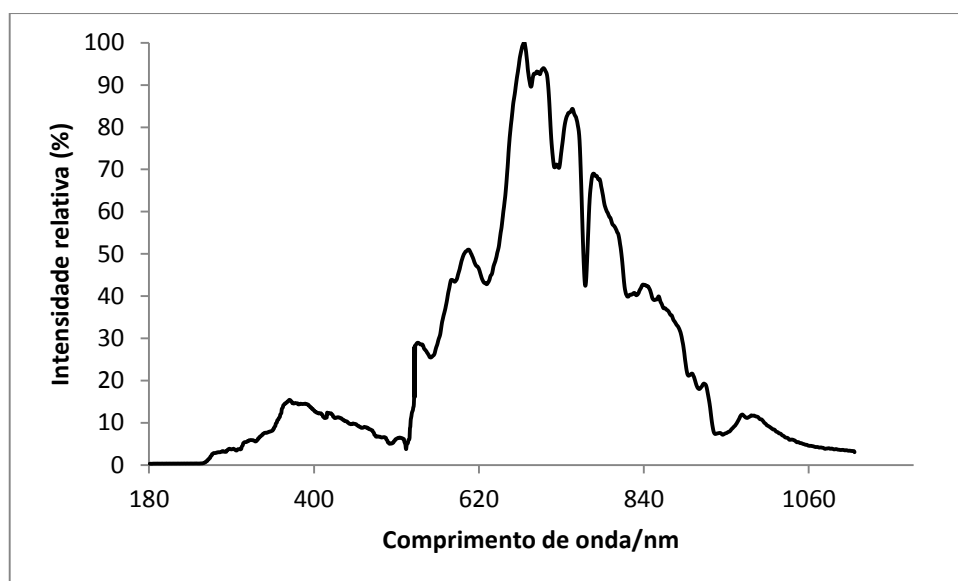


Figura 4. 5- Espectro de emissão da radiação solar, obtido às 12 horas de um dia ensolarado.

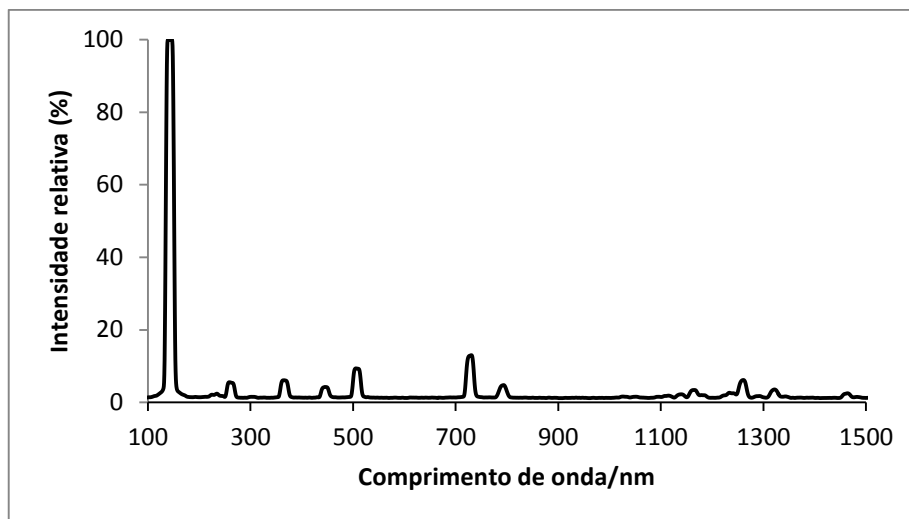


Figura 4. 6- Espectro de emissão da fonte de luz de 5 W presente na câmara de testes com emissão UVC.

O aço foi utilizado na construção do equipamento por ser um bom condutor de calor, evitando assim o aquecimento excessivo das amostras, é rígido, fotoestável e protege o operador contra as emissões da fonte de luz. Apesar da caixa não simular um ambiente real, cria um ambiente favorável para as medições. Outra caixa feita em papel pluma também na cor preta de 50 mm de altura, 45 mm de comprimento e 30 mm de largura é inserida no centro da câmara. Nessa caixa há uma abertura para inserção da lâmina onde as amostras foram colocadas. Na caixa está presente o sensor do espectrofotômetro (StellarNet, UVN SR-200) que foi utilizado para a captação da radiação transmitida através das amostras utilizadas nos testes.

4.2.2 Determinação dos parâmetros experimentais

Afim se obter parâmetros experimentais compatíveis com os parâmetros de metodologias determinadas pela legislação vigente, a iluminância média e a temperatura da câmara foram determinadas.

A iluminância é uma grandeza de luminosidade que faz a relação entre o fluxo luminoso que incide na direção perpendicular a uma superfície e a sua área. Na prática, é a quantidade de luz dentro de um ambiente. Sua unidade de medida é o lux (lx). Para medi-la, utiliza-se um aparelho denominado luxímetro. (RYER, 1998)

Para a determinação da luminosidade média dentro da câmara de testes foram escolhidos 9 pontos no interior da caixa. O luxímetro foi posicionado em cada um desses pontos, a fonte de irradiação solar foi ligada e a luminosidade média foi determinada. A posição dos pontos na câmara de testes está ilustrada na FIG. 4.7.



Figura 4. 7 - Posição dos pontos para determinação da luminosidade na câmara de testes.

A temperatura da câmara de testes foi determinada por meio de um termômetro de mercúrio que foi inserido no interior da câmara de testes. O valor da temperatura foi monitorado em intervalos de 15 minutos em um período de 2 horas. O período de 2 horas foi escolhido por ser tempo máximo que a câmara de testes ficou ligada para avaliação das amostras fotoprotetoras usadas neste trabalho.

4.2.3 Determinação do FPS experimental das amostras comerciais e TiO_2

O FPS das amostras comerciais foi avaliado por meio do monitoramento do espectro de transmissão da radiação através das mesmas utilizando o espectrofotômetro EstellarNet UVN SR-200. A área compreendida entre 290 e 320 nm do espectro de transmissão da radiação através da lâmina foi determinada primeiramente sem aplicação da amostra. Em seguida, cerca de 15,46 mg de cada amostra comercial testada foi colocada e espalhada sobre a lâmina (24x32 mm) de modo que houvesse cerca de 2,00

mg de amostra por cm² de lâmina, quantidade recomendada pela ANVISA para aplicação de filtro solar na pele. A FIG. 4.8 ilustra a distribuição do protetor na lâmina.



Figura 4. 8-Vista lateral da distribuição do fotoprotetor na lâmina para testes.

A lâmina foi então colocada sobre uma segunda caixa de onde recebeu a radiação proveniente da lâmpada que simula a radiação solar. A amostra foi então, irradiada por 45 minutos e o espectro de transmissão foi novamente obtido. Por meio da relação entre a área do espectro antes e após a aplicação da amostra foi possível obter informações acerca da capacidade de absorção e/ou reflexão, ou seja, a radiação não transmitida através dos protetores testados.

Considerando que toda energia foi conservada, parte da radiação incidente é transmitida e a outra parte é absorvida e/ou refletida pela amostra, dependendo das propriedades dos protetores analisados, a porcentagem de absorção e/ou reflexão da radiação UV dos protetores solares pode ser obtida por meio da relação mostrada na Equação 4.1.

$$\%AR = 100 - \frac{100 \times At}{Ao} \quad 4.1$$

Onde:

%AR = porcentagem de radiação UV absorvida e/ou refletida pela amostra;

Ao = área do espectro de emissão através da lâmina antes da aplicação das amostras;

At = área do espectro de transmissão através da lâmina + película da amostra.

O FPS experimental foi determinado com base em uma relação obtida por Sayre e colaboradores (1979). Os autores demonstraram que a porcentagem da radiação UVB não transmitida através dos protetores está relacionada com o valor do FPS dos produtos conforme mostra a Equação 4.2.

$$\%NT = \left(1 - \frac{1}{FPS}\right) \times 100 \quad 4.2$$

Em que,

%NT = porcentagem de radiação UVB não transmitida através dos protetores solares.

FPS = fator de proteção solar.

Dessa forma, obtendo os valores de %AR e fazendo-os equivalentes a %NT da Equação 4.4 foi possível determinar o valor do FPS *in vitro* das amostras comerciais e compará-los com os valores fornecidos pelos fabricantes.

Para verificar a exatidão e reprodutibilidade do método, 9 protetores solares comerciais autorizados pela ANVISA e uma formulação de TiO₂ 25% em gel foram utilizados. A Tabela 4.1 sumariza as características dos 9 protetores solares analisados, indicados por P e da formulação de TiO₂. Na tabela encontra-se o FPS indicado pelo fabricante de cada marca, bem como o tipo de filtro utilizado, protetor solar inorgânico (I) com capacidade de refletir a radiação (R), orgânico (O), com capacidade para absorver a radiação (A), ou ambas as características.

A fim de se analisar o comportamento de um protetor exclusivamente físico, foi preparada uma formulação em gel de TiO₂ 25 % e seu FPS teórico foi determinado por meio do programa *Sunscreen Simulator* disponível no site da BASF. Os dados para essa formulação, também se encontram na Tabela abaixo.

Tabela 4. 1- Dados dos filtros solares comerciais utilizados e formulação de TiO₂.

Massa de amostra utilizada = 15,2 ± 0,0012 mg por cm ² de lâmina			
Filtro/formulação	FPS indicado pelo fabricante	Tipo de filtro*	Característica da proteção**
P1	60	I/O	A/R
P2	60	I/O	A/R
P3	60	I/O	A/R
P4	50	I/O	A/R
P5	50	I/O	A/R
P6	50	O	A
P7	30	I/O	A/R
P8	30	I/O	A/R
P9	30	I/O	A/R
TiO ₂ 25%	40	I	R

* I = filtro inorgânico; O = filtro orgânico; I/O = filtro inorgânico e orgânico

**A= proteção por absorção da radiação; R= proteção por reflexão da radiação; A/R= proteção por absorção e reflexão da radiação.

4.2.4 Avaliação da capacidade de proteção frente à radiação UV (180 a 400 nm)

A capacidade de proteção contra a radiação UV ao longo do tempo das amostras foi avaliada de forma semelhante à metodologia para determinação do FPS descrito no item 4.2.3, no entanto, a região monitorada foi a área compreendida entre 180 e 400 nm e o monitoramento espectral foi realizado em intervalos de 15 minutos num período de 2 horas, período escolhido por ser o tempo geralmente indicado para sucessivas aplicações de protetores na pele. Dessa forma, foi possível obter a porcentagem de decaimento da proteção UV dos protetores solares analisados e analisar a eficiência dos mesmos.

Segunda Parte

4.2.5 Obtenção dos extratos brutos

As partes de interesse de cada espécie foram secas à temperatura ambiente, fragmentadas e submetidas ao processo de extração por imersão em metanol (PA). A

matéria vegetal ficou em repouso e ao abrigo da luz por quatro dias e, após esse tempo, foi filtrada em filtro de 0,45 µm (Milipore). Após a filtração, o solvente foi removido por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, para a obtenção dos respectivos extratos brutos e suas massas correspondentes.

4.2.6 Purificação dos extratos brutos por Cromatografia em coluna aberta

Essa etapa visou à obtenção de frações mais purificadas a partir do extrato bruto vegetal e baseia-se na afinidade dos compostos presentes no extrato bruto com a fase móvel ou a fase estacionária utilizada (COLLINS, 2006). Os solventes utilizados na fase móvel foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e misturas binárias desses solventes em proporções adequadas. As escolhas dos solventes foi realizada com base em experimentos prévios à esse trabalho. A ordem de passagem dos solventes seguiu a ordem de polaridade dos mesmos, começando do solvente com menor polaridade e finalizando com aquele de maior polaridade. A Tabela 4.2 mostra a ordem de eluição dos solventes e suas respectivas proporções.

Tabela 4. 2 - Ordem de eluição e proporção das fases móvel utilizadas

Ordem de eluição	Fase móvel	Proporção
1	Hex	100%
2	Hex:DCM	3:1
3	Hex:DCM	1:1
4	Hex:DCM	1:3
5	DCM	100%
6	DCM:AcET	3:1
7	DCM:AcET	1:1
8	DCM:AcET	1:3
9	AcET	100%
10	AcET:ETOH	3:1
11	AcET:ETOH	1:1
12	AcET:ETOH	1:3
13	ETOH	100%

Hex: Hexano; DCM: Dicloro metano; AcET: Acetato de etila; ETOH: Etanol

As frações das bandas separadas na coluna foram coletadas em frascos âmbar e acondicionadas em balões de destilação para redução de volume e concentração em evaporador rotativo. O volume final obtido foi transferido para frascos previamente

tarados e a evaporação do solvente residual foi realizada em um speedvac. Após a retirada de todo o solvente, os frascos foram novamente pesados e a massa das frações obtidas foi determinada. O esquema ilustrado na FIG. 4.9 sintetiza as metodologias descritas em 4.2.5 e 4.2.6.

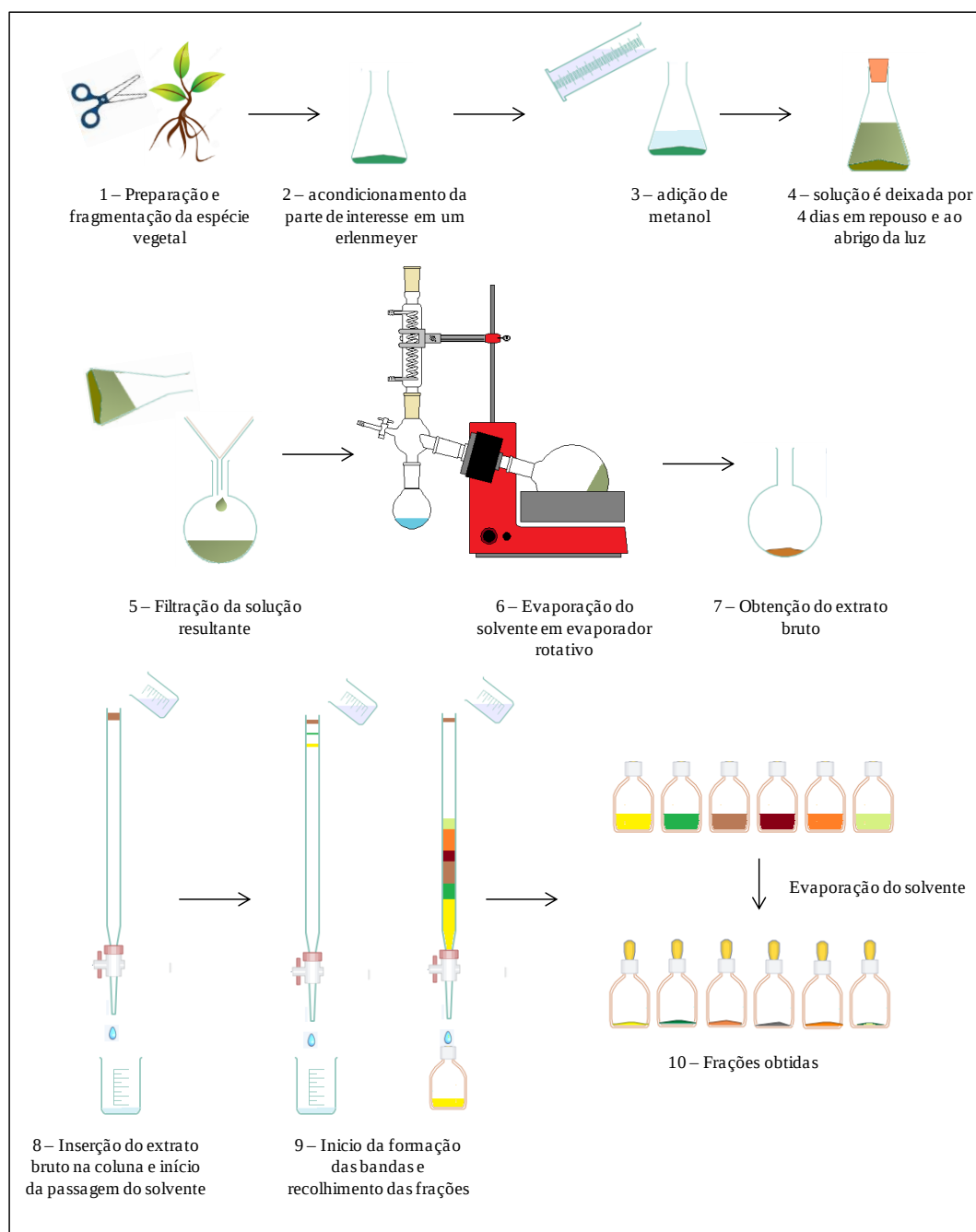


Figura 4. 9 – Esquema simplificado da metodologia para obtenção das frações dos extratos vegetais, desde a obtenção do extrato bruto até as frações purificadas.

4.2.7 Monitoramento da faixa espectral das frações

Soluções de concentração 2,0 mg/mL dos extratos em etanol foram preparadas e 200 µL de cada solução foi transferido para uma placa de 96 poços de quartzo. Os espectros das frações na faixa de 200 a 500 nm foram então, obtidos, e exportados em arquivos para serem tratados no Excel. A faixa espectral dos extratos foi analisada quanto à correspondência nas regiões UVA, UVB e UVC, utilizando o espectrofotômetro Multiskan GO.

4.2.8 Preparação das formulações fotoprotetoras vegetais

Para análise da capacidade fotoprotetora das frações e extratos vegetais foi necessária a incorporação dos mesmos em veículos. Três diferentes veículos foram testados: óleo mineral (Farmax), óleo de Rosa Mosqueta (Herbarium) e Gel Natrosol (Racine) 1% m/m preparado em água. Os veículos foram escolhidos devido à facilidade de manipulação e aquisição. Os três veículos testados foram analisados quanto à capacidade de solubilização dos extratos e frações vegetais e capacidade de absorção de radiação na região UV.

A concentração máxima de filtros orgânicos autorizados pela ANVISA é de 15%, sendo que a concentração mínima normalmente encontrada é de 3%. Portanto, as formulações foram preparadas em concentrações de 9% m/m no gel, concentração média entre a mínima normalmente utilizada e a máxima permitida.

4.2.9 Determinação do comprimento de onda crítico e FPS pelo método de Mansur das frações e extratos brutos

A determinação desses dois parâmetros teve como objetivo determinar quais frações e extratos brutos estão aptos a serem usados em fotoproteção. O método de Mansur (1986) foi escolhido para determinação do FPS, pois se trata de um método rápido, reprodutível e adequa-se facilmente às condições dos extratos e frações, já que os mesmos são solúveis no solvente utilizado.

- Comprimento de onda crítico

O comprimento de onda crítico (λ_c) é definido como o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica, que começa em 290 nanômetros é igual a 90% da área integrada ($A\lambda$) entre 290 e 400 nanômetros (COLIPA, 2009). O valor do λ_c pode ser determinado por meio da Equação. 4.5.

$$\int_{290}^{\lambda_c} A\lambda d\lambda = 0,9 \int_{290}^{400} A\lambda d\lambda \quad 4.3$$

A determinação do comprimento de onda crítico das frações e extratos brutos das três espécies foi realizada pelo programa Origin Graphing & Analysis 2015. Os espectros para determinação do λ_c foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Multiskan Go. A partir dos resultados obtidos, selecionaram-se as frações e extratos das espécies que possuem amplo espectro de absorção (absorção UVA e UVB).

- Determinação do FPS

Para a determinação do FPS das frações, foi utilizado o método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (MANSUR, 1986). As soluções para leitura no espectrofotômetro, Multiskan GO, foram preparadas em metanol, de modo que a concentração final é de 0,2 mg/mL, concentração padronizada para o cálculo do FPS.

A análise foi feita em triplicatas e as absorbâncias das soluções das amostras foram medidas no espectrofotômetro. O FPS médio foi calculado pela Eq. 4.5 (Cálculo do FPS segundo Mansur).

$$FPS = FC. \sum_{290}^{20} E(\lambda).I(\lambda).abs(\lambda) \quad 4.4$$

Em que:

FC = fator de correção (igual a 10);

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ;

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ;

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da fração no comprimento de onda (λ).

O efeito eritematogênico presente na equação acima pode ser definido como primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta (ANVISA, 2012). A intensidade desse efeito depende do tempo de exposição, do comprimento de onda da radiação e da intensidade da luz incidente (SCHULZE, 1956).

A Tabela 4.3 mostra a relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.

Tabela 4. 3 - Efeito eritematogênico e intensidade da radiação

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018

4.2.10 Determinação da capacidade de proteção das formulações de frações e extratos brutos vegetais por meio da câmara de testes

As amostras vegetais foram irradiadas por 2 horas para obtenção do comportamento das mesmas frente à radiação UV, e por 45 minutos para determinação do FPS, conforme metodologias descritas em 4.2.3.1 e 4.2.3.2. Os valores do FPS obtidos pela nova metodologia foram comparados ao método desenvolvido e validado por Mansur (1986).

4.2.11 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância de pareamento utilizando o ANOVA one – way para variáveis não paramétricas. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 4.. A análise visou, fundamentalmente, verificar se existe uma diferença significativa entre as médias dos resultados obtidos. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo.

As análises estatísticas compararam os valores de FPS fornecidos pelos fabricantes das 9 amostras comerciais com os valores de FPS determinados pela câmara de testes. Além disso, os valores de FPS das formulações vegetais pelo método de Mansur (1986) foram também comparados com os valores obtidos por meio da câmara de testes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinações dos parâmetros experimentais

As medidas da iluminância foram tomadas em nove pontos distintos da câmara de testes. Os valores obtidos para média e desvio padrão dos resultados do experimento foram respectivamente 487,63 lx e 75,10 lx. Os valores para cada ponto estão representados na Tabela 5.1.

A carta de controle ilustrada na FIG. 5.1, foi utilizada, para determinar estatisticamente os limites de controle da iluminância, no interior da câmara de testes. O limite superior foi obtido somando a média com mais um desvio padrão ($+1\sigma$), e limite inferior, subtraindo da média um desvio padrão (-1σ). Dessa forma, obteve-se a primeira faixa de dispersão dos valores no gráfico), que se encontra entre as linhas pontilhadas. Com esse resultado pode-se interpretar que a iluminância dentro da câmara de testes, no geral, varia entre 562,73 lx e 412,52 lx, ou seja, a caixa apresentou uma ampla faixa de iluminância ao longo do seu volume. No entanto, o valor da iluminância média encontra-se dentro da faixa recomendada pela ANVISA, por meio do protocolo estipulado pela FDA (21 CFR Part 352 et al, 1999.), para testes de fotoproteção, *in vivo*, entre 450 e 500 lx. A temperatura no interior da câmara de testes manteve-se a 25 ± 2 °C, seguindo recomendações da COLIPA e FDA em manter as condições experimentais em temperaturas abaixo de 40 °C.

Tabela 5. 1 – Valores da iluminância em nove pontos da câmara de testes.

Ponto da câmara de testes	Iluminância/lx
1	425
2	468
3	594
4	445
5	464
6	619
7	432
8	454
9	613
Média	487,63

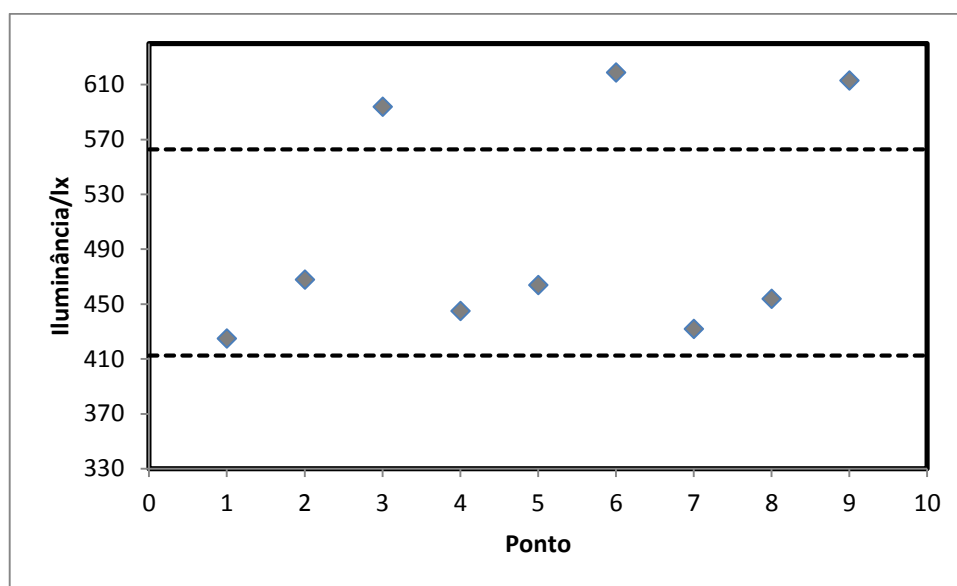


Figura 5. 1 -Gráfico de dispersão dos valores obtidos na verificação da iluminação dentro da câmara de testes. A linha pontilhada superior indica o valor da média +1 desvio padrão ($+1\sigma$) e a linha inferior, o valor da média -1 desvio (-1σ) padrão.

5.2 Validação do método com amostras comerciais e formulação de TiO_2

5.2.1 Determinação do FPS experimental das amostras comerciais e TiO_2

Esse procedimento teve como objetivo validar a metodologia utilizada para avaliar a capacidade fotoprotetora de formulações de extratos vegetais oriundos do Cerrado Brasileiro.

Os valores obtidos do FPS experimental das amostras fotoprotetoras comerciais foram determinados por meio da relação determinada por Sayre e colaboradores (1979), mostrada na Equação 4.4. A Tabela 5.2 relaciona os valores de porcentagem de radiação UVB absorvida/refletida com o FPS declarado pelo fabricante e o FPS obtido por meio da câmara de testes.

Tabela 5. 2– Comparação entre o FPS fornecido pelo fabricante e o FPS experimental por meio da câmara de testes

Protetor solar	% de radiação UVB absorvida/refletida	FPS experimental	FPS declarado pelo fabricante
P1	98,1	51,7	60
P2	98,0	50,2	60
P3	97,8	48,2	60
P4	97,9	49,5	50
P5	97,1	45,4	50
P6	97,4	48,9	50
P7	95,8	27,3	30
P8	96,4	29,1	30
P9	95,9	27,6	30
TiO ₂ 25 %	96,2	28,4	40

De acordo com os dados mostrados na Tabela 5.5 é possível observar que os protetores P1, P2 e P3 apresentaram valores muito divergentes daqueles declarados pelos fabricantes. No caso de P3, a diferença chega a quase 20 %. Entre os protetores de FPS 50, P5 apresentou o pior desempenho com pouco menos de 10 % de diferença entre o valor experimental e o informado. O mesmo valor foi encontrado para o protetor P7 de FPS 30. A formulação de dióxido de titânio, embora estável, apresentou FPS cerca de 30 % a menos que o valor teórico. A divergência nos valores pode ser atribuída à forma de preparo da formulação que pôde ter sido distinta daquela fornecida pelo *Sunscreen Simulator*. A diferença entre as características das partículas do óxido utilizado também pode ter sido um fator relevante para a divergência encontrada. Enquanto as partículas utilizadas pelo *Sunscreen Simulator* possuem tamanho médio na ordem de grandeza de 10^{-9} m, as partículas utilizadas na formulação preparada para testes apresenta ordem de grandeza 10^{-6} m.

Segundo a ANVISA, a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) deve ser realizada seguindo estritamente uma das seguintes referências ou suas atualizações: *Sunscreen drug products for over-the-counter human use* (FDA, 2006) ou *International Sun Protection Factor (SPF) Test Method*, (COLIPA, 2006). A norma da FDA para protetores solares estipula que a média final encontrada para valores de FPS não pode ser maior que 5% em relação ao FPS declarado na embalagem do produto pelo seu

fabricante. Assim como no método anterior, a COLIPA também determina que o FPS também seja obtido a partir da média de medições. Os parâmetros para a aprovação permitem uma variação de +20 % e -20 % em relação ao FPS declarado. A FIG 5.2 mostra os dados obtidos para os nove protetores solares e a formulação de TiO_2 e os limites aceitáveis de variação do FPS segundo as exigências da FDA e COLIPA.

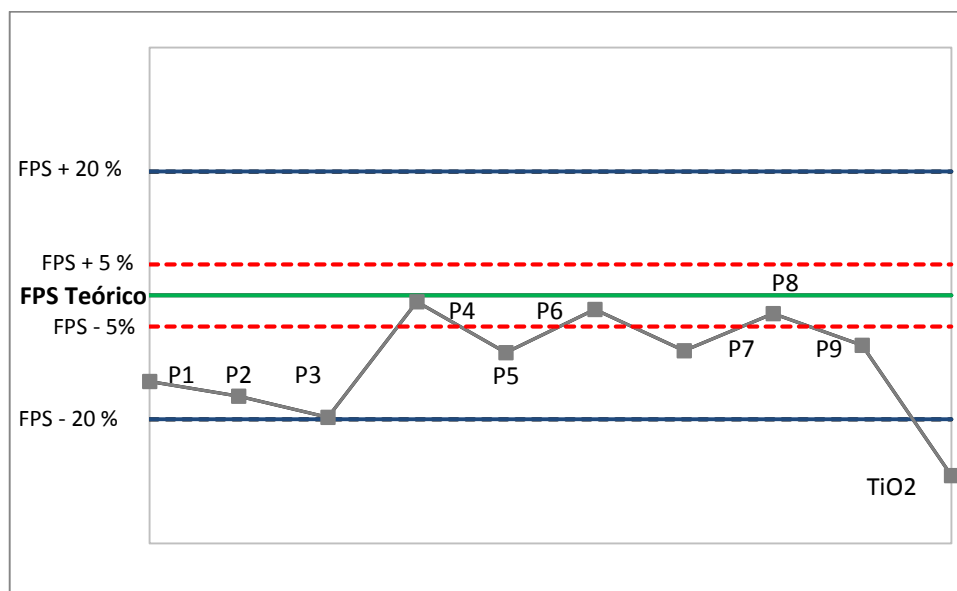


Figura 5. 2 - Limites estabelecidos pelas agências regulamentadoras para aceitação de protetores solares: COLIPA: + 20 % e - 20 % de variação em relação ao FPS fornecido pelo fabricante (linha contínua azul); Limites estabelecidos pela FDA: + 5 % e - 5 % de variação em relação ao FPS fornecido pelo fabricante (linha tracejada vermelha); FPS teórico fornecido pelo fabricante (linha contínua verde).

A metodologia estatística estipulada pela COLIPA é menos rigorosa que a metodologia da FDA, por essa razão, apenas a formulação de TiO_2 manteve-se fora dos padrões exigidos por essa agência. Pela metodologia da FDA, apenas P4, P6 e P8 atenderam os critérios exigidos para a aceitação do protetor solar

As variações encontradas nos valores dos nove os protetores comerciais testados frente aos seus respectivos valores mencionados pelo fabricante não apresentaram variações significativas ($p > 0,05$). O resultado nos permite dizer que as medições realizadas pela metodologia proposta estão de acordo com os valores mencionados pelo fabricante, corroborando a análise.

5.2.2 Avaliação da capacidade de proteção frente à radiação UV (180 a 400 nm)

A capacidade de proteção perante a radiação UV na região compreendida entre 180 e 400 nm dos nove protetores comerciais e a formulação 25% de TiO₂ foi analisada em intervalos de 15 minutos, em um período de 2 horas. Foram analisados protetores com FPS 60, 50 e 30 e TiO₂ 25% com FPS 40.

A FIG.5.3 ilustra o comportamento ao longo de 2 horas de radiação dos protetores P1, P2 e P3. Os resultados mostrados são valores médios de um total de três repetições de cada protetor.

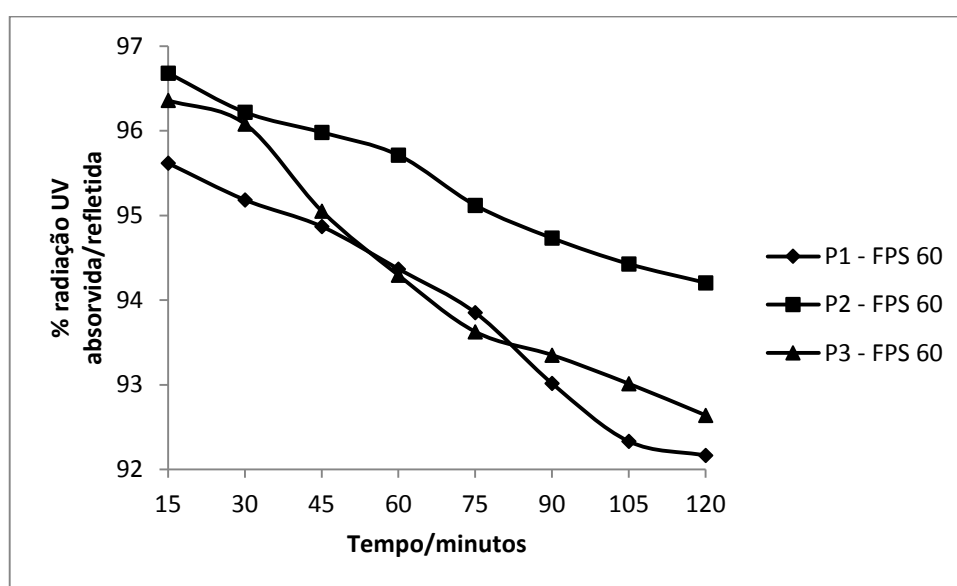


Figura 5. 3 – Comportamento de protetores comerciais FPS 60 frente a radiação solar em um período de 120 minutos.

Os resultados para protetores de FPS 60 mostram uma tendência à perda de proteção contra radiação UV ocasionada pela diminuição da porcentagem de absorção e/ou reflexão da radiação UV incidente sobre a amostra. O fotoprotetor P2 foi o que se manteve mais estável durante o período de duas horas. Com uma capacidade de proteção contra radiação UV de $96,68 \pm 0,08$ % no tempo de 15 minutos e $94,20 \pm 0,46$ % no tempo final de 120 minutos. Perdeu cerca de 2,56 % da sua capacidade fotoprotetora, contra 3,61 % para P1 e 3,86 % para P3. A Tabela 5.3 sumariza os dados obtidos para protetores comerciais de FPS 60.

Tabela 5. 3 – Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 60.

Protetor	% de absorção/reflexão média da radiação UV	% de decaimento da proteção ao longo de 2 horas
P1	$93,9 \pm 1,3$	3,6
P2	$95,8 \pm 0,9$	2,6
P3	$94,3 \pm 1,4$	3,9

Na FIG 5.4 está representado o comportamento frente à radiação solar dos protetores comerciais de FPS 50. Assim como os protetores de FPS 60, os resultados mostrados são valores médios de um total de três repetições de cada protetor.

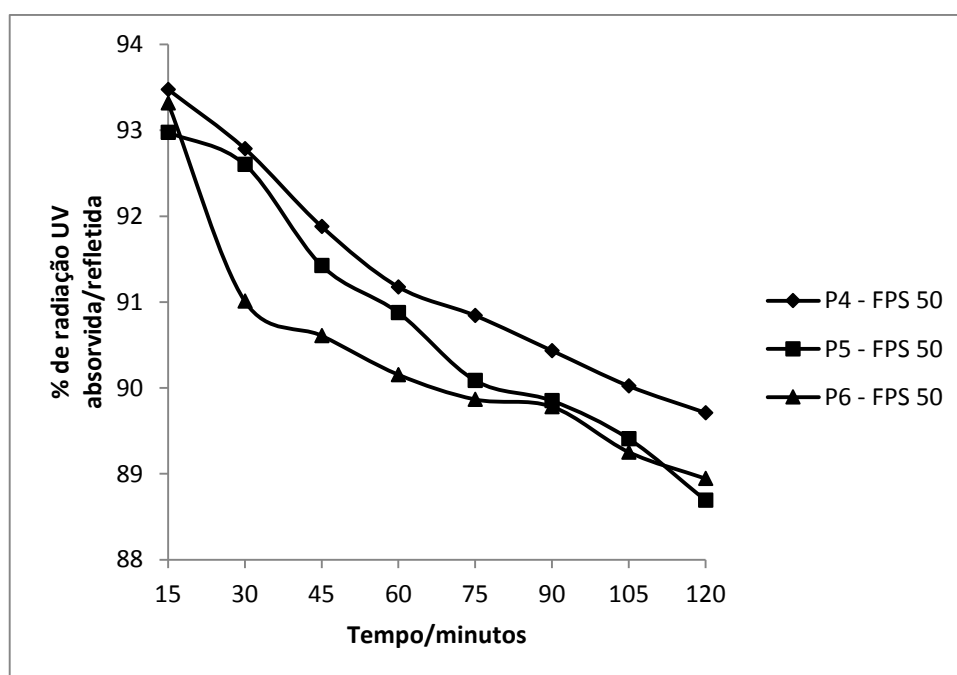


Figura 5. 4 – Comportamento de protetores comerciais FPS 50 frente a radiação solar em um período 120 minutos

Protetores solares de FPS 50 também apresentaram a mesma tendência de perda da capacidade de absorver e/ou refletir a radiação UV proveniente da fonte de irradiação. No entanto, esses protetores mostraram-se menos eficaz quanto à capacidade de manter a proteção durante as duas horas, se comparado com os fotoprotetores de FPS 60. Em todos os caso, a perda da capacidade fotoprotetora inicial alcançou mais de 4 %.

Tabela 5. 4 – Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 50.

Protetor	% de proteção média contra radiação UV	% de decaimento da proteção ao longo de 2 horas
P4	91,3 ± 1,3	4,1
P5	90,7 ± 1,5	4,6
P6	90,4 ± 1,4	4,7

Sob as mesmas condições dos protetores de FPS 60 e FPS 50, a FIG 5.5 ilustra o comportamento dos protetores comerciais de FPS 30.

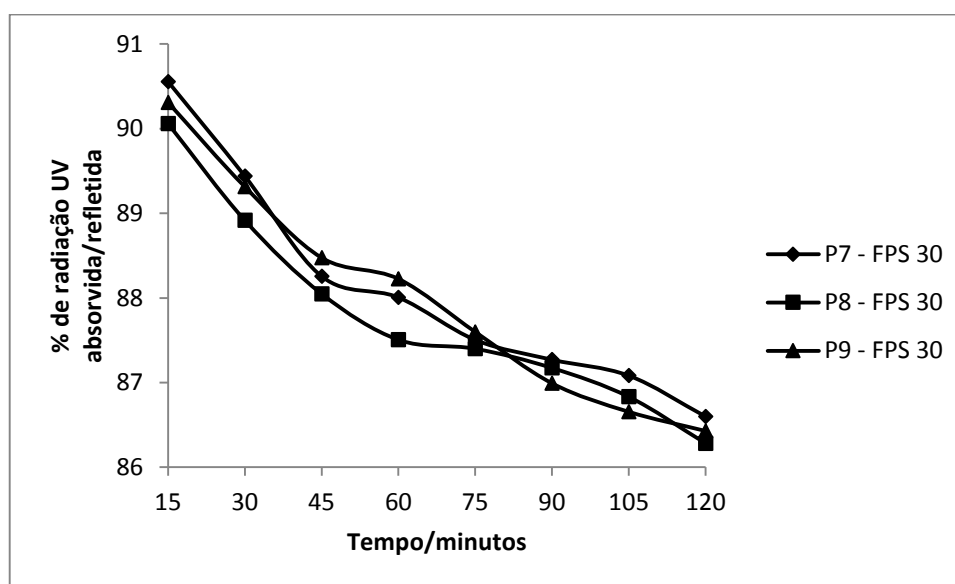


Figura 5. 5 – Comportamento de protetores comerciais FPS 30 frente a radiação solar em um período de 120 minutos

Assim como os demais protetores, os protetores de FPS 30 também perdem sua capacidade de absorver e/ou refletir a radiação UV ao longo do tempo. Entre os 9 produtos analisados, os de FPS 30 foram os que apresentaram maior semelhança quanto a capacidade de proteção média. Os protetores desse grupo também apresentaram porcentagem de decaimento da proteção superior a 4% assim como os de FPS 50. Na Tabela 5.5 estão os dados dos protetores de FPS 30.

Tabela 5. 5 - Dados de porcentagem de absorção/reflexão da radiação UV e de decaimento da proteção para protetores comerciais de FPS 30.

Protetor	% de proteção média contra radiação UV	% de decaimento da proteção ao longo de 2 horas
P7	88,1 ± 1,3	4,4
P8	87,8 ± 1,2	4,2
P9	88,0 ± 1,5	4,3

De modo geral, foi possível observar que os nove protetores tendem a perder sua capacidade de proteção contra radiação UV ao longo do período de 2 horas. Entretanto, não é possível prever uma tendência quanto a períodos de estabilidade entre os produtos. Formulações comerciais apresentam inúmeras substâncias combinadas que podem ou não perder suas propriedades quando expostas ao sol. Em algumas formulações podem existir substâncias que se degradam depois de certo período e outras que mantêm estáveis por mais tempo, essas características variam de produto para produto (BRASIL, 2004; NEVES, 2008). Por exemplo, as benzofenonas, presentes nos protetores P1, P2, P3, P5 e P9, absorvem de forma eficiente as radiações UVA e UVB, porém, a estabilidade desses filtros frente à radiação solar é menor quando comparado aos filtros derivados do ácido 4-metilcinamato (ANTONIOU et al., 2008), presente em todos os protetores testados. O filtro orgânico octocryleno, presente no protetor P2 é altamente estável e, ainda, é capaz de estabilizar outros filtros orgânicos (NEVES, 2008). Ao contrário da Avobenzona que está presente em seis dos nove protetores comerciais testados e perde cerca de 50 % da sua eficiência protetora em um períodos menores que 60 minutos (NEVES, 2008). O protetor solar ideal seria aquele que pudesse manter a estabilidade durante longos períodos (AUTIER, 1999). Na legislação atual (RDC nº 30, 2012) não há regras quanto à perda da capacidade protetora ao longo do tempo, no entanto, exige que no rótulo do produto ajam informações sobre o período que se deve repassar o produto. Normalmente, os fabricantes recomendam que esse período seja de 2 horas.

A grande maioria dos filtros analisados apresentam filtros orgânicos e inorgânicos em sua composição, com exceção do filtro P6 que só apresenta filtros orgânicos. Os filtros orgânicos são ditos menos estáveis que os inorgânicos em presença da luz (FLOR et al., 2007), fato esse que se pode comprovar por meio da porcentagem

de decaimento da proteção ao longo do tempo para o protetor P6, o valor de 4,68 % foi o maior obtido entre os nove protetores analisados.

O comportamento da formulação de TiO_2 25 % frente a radiação UV também foi monitorado em um período de 2 horas e se encontra na FIG.5.6

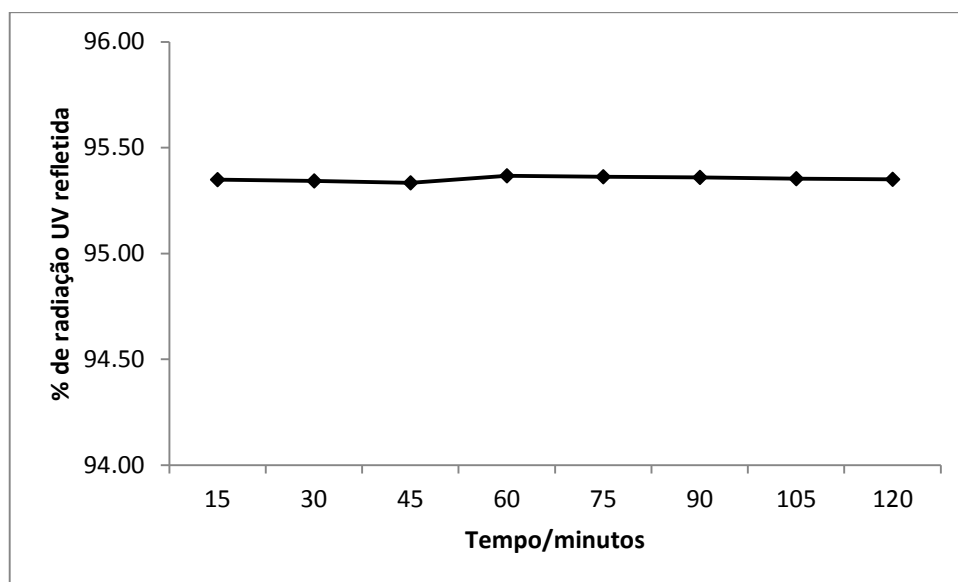


Figura 5. 6 – Comportamento da formulação de TiO_2 frente a radiação solar em um período de 120 minutos.

A porcentagem média de radiação UV refletida para a formulação de TiO_2 foi de $95,40 \pm 0,01$ %, a porcentagem de decaimento da proteção foi de apenas 0,001 %, demonstrando a estabilidade desse filtro frente a radiação solar. Apesar de ter a vantagem da estabilidade, uma formulação fotoprotetora apenas com filtro inorgânico como o TiO_2 não é viável (REETH, 2005). Esse óxido possui baixíssima solubilidade em veículos normalmente usados, portanto, a utilização da porcentagem máxima (25 %) deixa o protetor solar com um aspecto não agradável e de difícil espalhamento na pele. Por essa razão, a quantidade de óxido é diminuída e para a obtenção de uma proteção contra os raios UV adequada, são adicionados filtros orgânicos às formulações (ANTONIOU et al., 2008).

5.3 Obtenção e monitoramento da faixa espectral das frações e extratos brutos

A eluição dos extratos brutos por meio da coluna cromatográfica resultou em frações purificadas para cada uma das três espécies vegetais utilizadas. A Tabela 5.6 sumariza a quantidade de frações obtidas a partir de cada planta.

Tabela 5. 6 - Quantidade de frações obtidas por cromatografia

Espécie vegetal	Frações
A	10
B	4
C	6

As frações obtidas, bem como os extratos brutos foram analisadas em um espectrofotômetro UV-VIS para se verificar a correspondência das mesmas nas regiões UVA, UVB e UVC.

Nas Tabelas 5.7, 5.8 e 5.9 encontram-se as massas das frações e extratos brutos obtidos e os rendimentos em relação à massa seca de cada uma das três espécies vegetais.

Tabela 5. 7 – Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal A

Espécie A, massa seca = 600,0012 g		
Extrato/Fração	Massa obtida/ g	Rendimento em relação à massa seca/ %
Extrato Bruto A	196,8004	32,80
A1	0,1314	0,02
A2	0,3238	0,05
A3	0,5282	0,09
A4	0,7661	0,13
A5	0,4978	0,08
A6	0,6123	0,10
A7	0,8764	0,15
A8	0,8323	0,14
A9	0,499	0,08
A10	0,5231	0,09

Tabela 5. 8 - Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal B

Espécie B, massa seca = 400,2313 g		
Extrato/Fração	Massa obtida/ g	Rendimento em relação à massa seca/ %
Extrato Bruto B	89,6518	22,40
B1	0,4312	0,11
B2	0,3987	0,10
B3	0,29004	0,07
B4	0,0673	0,02

Tabela 5. 9- Rendimentos obtidos em relação à massa seca da espécie vegetal C

Espécie C, massa seca = 400,0132 g		
Extrato/Fração	Massa obtida/ g	Rendimento em relação à massa seca/ %
Extrato Bruto C	112,8037	28,20
C1	0,5881	0,15
C2	0,6138	0,15
C3	0,5282	0,13
C4	0,3661	0,09
C5	0,6978	0,17
C6	0,6333	0,16

O perfil de absorção das 10 frações da espécie A e extrato bruto estão ilustrados nas FIGs 5.7, 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11. As frações foram separadas em grupos conforme semelhança entre seus perfis de absorção na região UV.

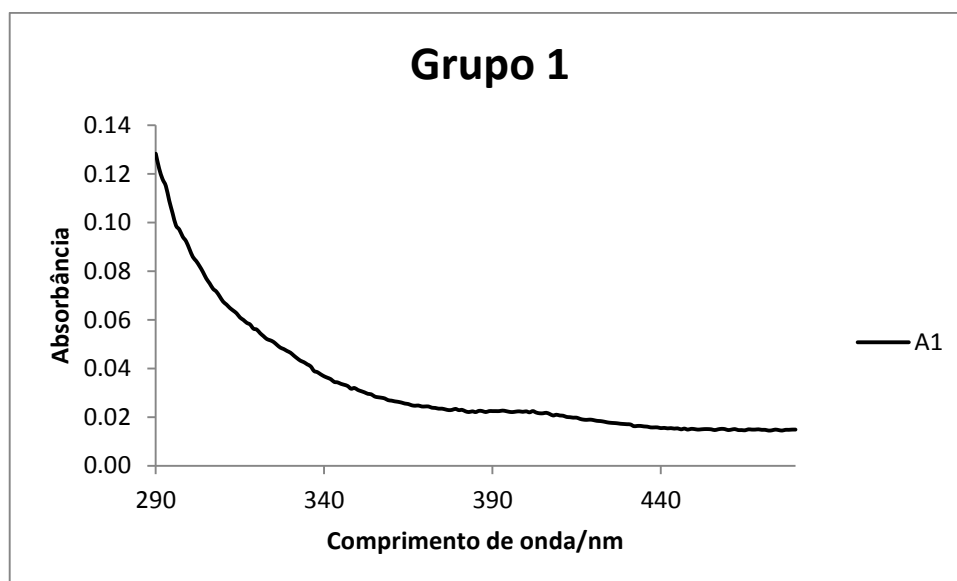


Figura 5. 7 - Perfil de absorção da A1 (Grupo 1).

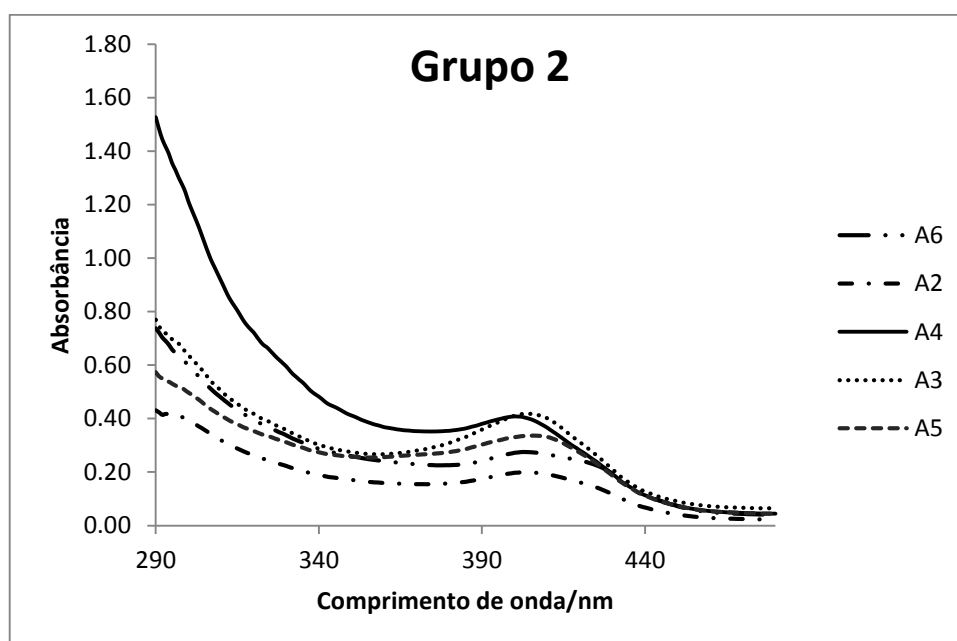


Figura 5. 8 - Perfil de absorção das frações A2, A3, A4, A5 e A6 (Grupo 2)

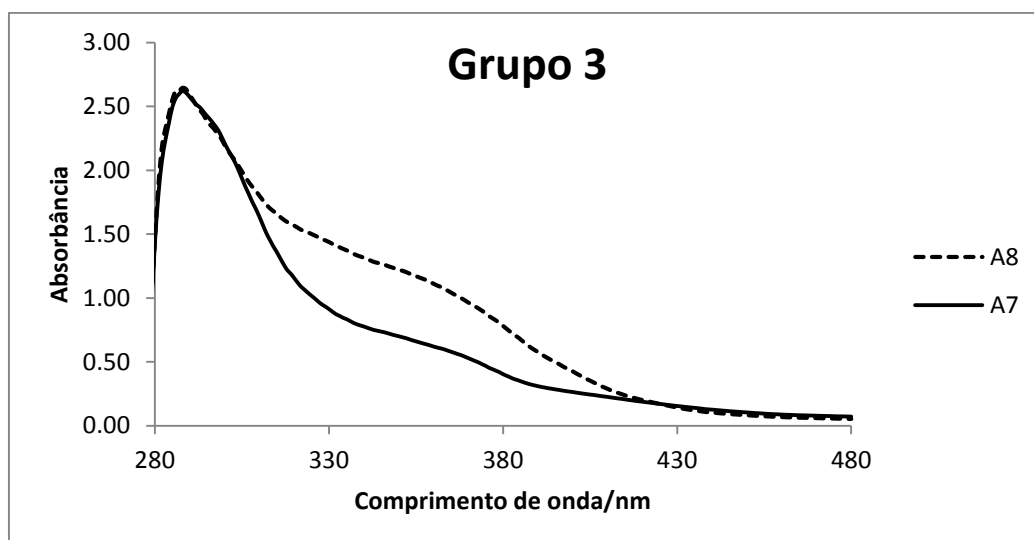


Figura 5. 9 - Perfil de absorção das frações A7 E A8 (Grupo 3).

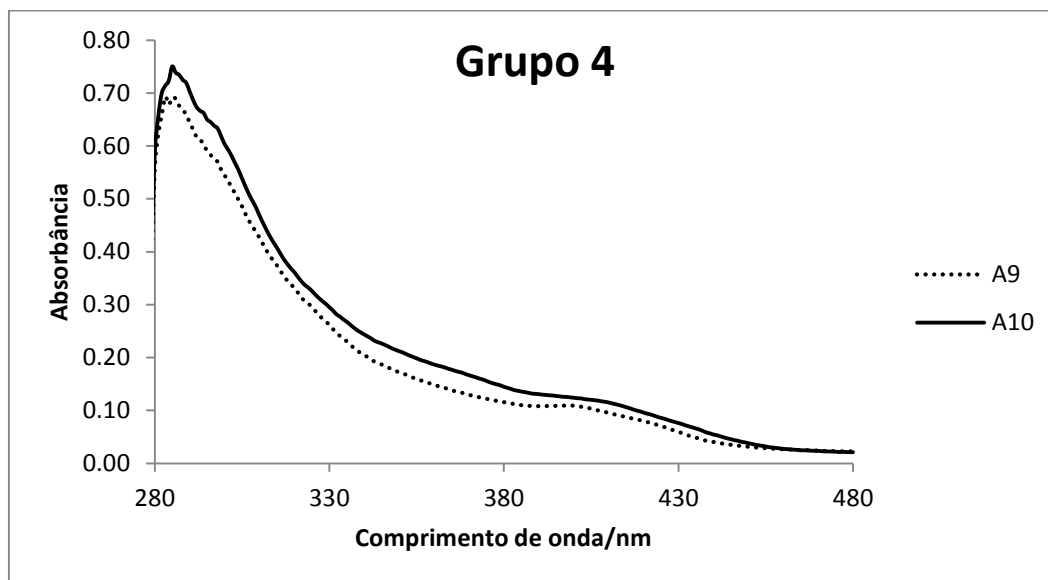


Figura 5. 10- Perfil de absorção das frações A7 E A8 (Grupo 4).

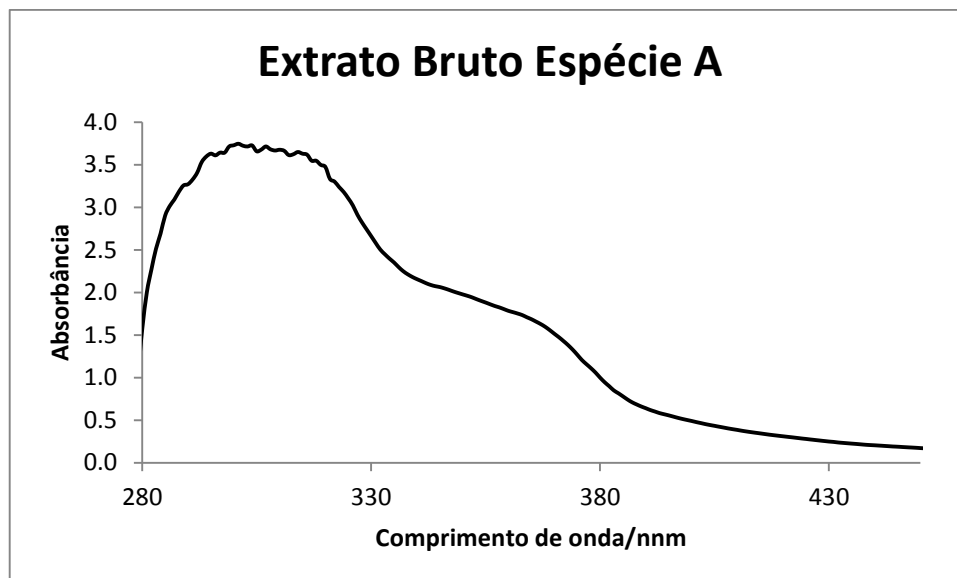


Figura 5. 11- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie A.

O perfil espectrométrico da fração A1 apresentou uma banda estreita de baixa absorção na região ultravioleta. Já as frações do Grupo 2 e Grupo 4 apresentaram absorção maior que a fração A1, variando de 0,40 a 1,70 para o Grupo 2 e 0,70 e 0,85 para o Grupo 4. Ambos os grupos apresentaram absorção entre 280 e 310 nm, região essa correspondente a região UVB do espectro eletromagnético. O Grupo 2 ainda absorveu em uma segunda região entre 380 e 430 nm. Essa região abrange pequena parte da região UVA e parte da região visível (violeta).

As frações do Grupo 3 apresentaram espectro mais amplo e absorbâncias mais elevadas que as demais frações. A absorção entre 280 e 370 nm abrange toda região UVB e boa parte da região UVA. O perfil espectrométrico do extrato bruto ilustrado na FIG.4.9, apresentou absorção mais intensa e espectro mais contínuo. A absorbância máxima de 3,5 abrange toda região UVB. Após o declínio dessa banda, uma nova banda começa a se formar, ainda com boa intensidade, na região compreendida entre 330 e 380 nm (região UVA).

Os perfis de absorção das frações e extrato bruto da espécie B também foram monitorados e encontram-se ilustrados nas FIGs 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

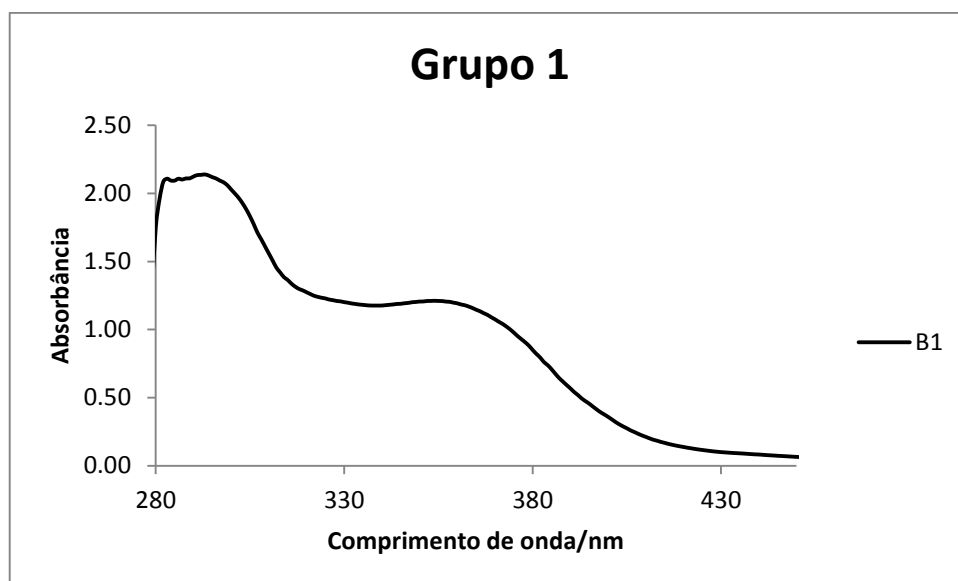


Figura 5. 12- Perfil de absorção da fração B1da espécie B (Grupo1).

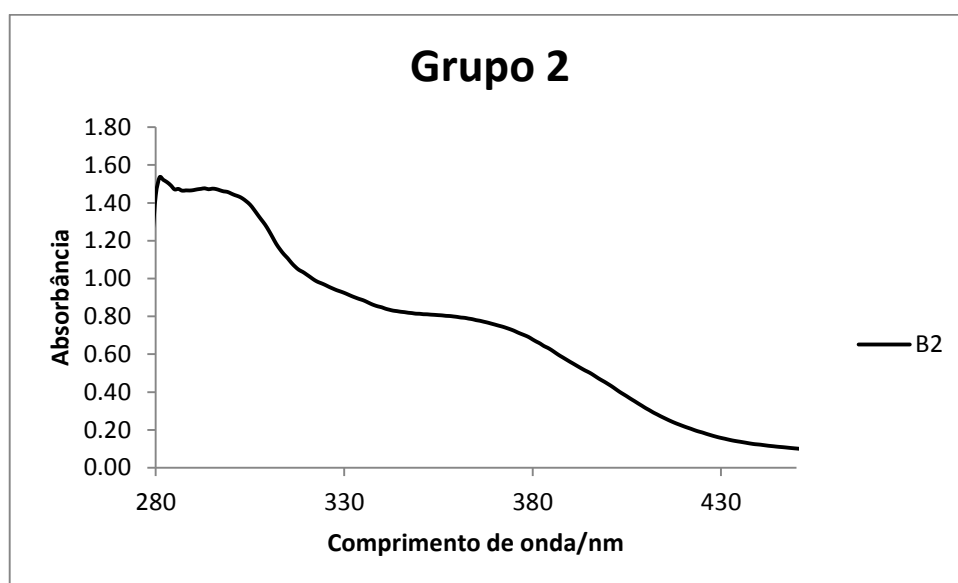


Figura 5. 13- Perfil de absorção da fração B2 (Grupo 2).

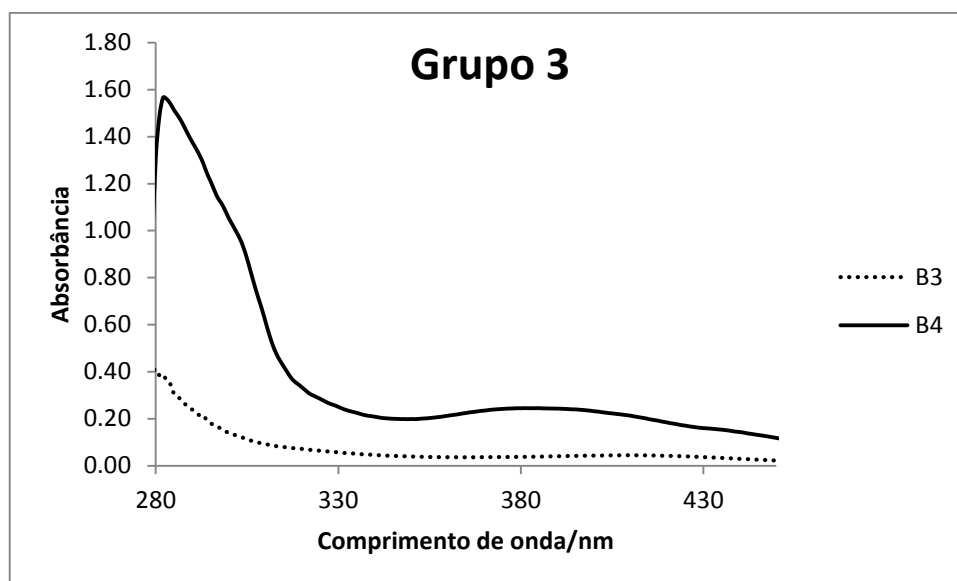


Figura 5. 14- Perfil de absorção das frações B3 e B4 (Grupo 3).

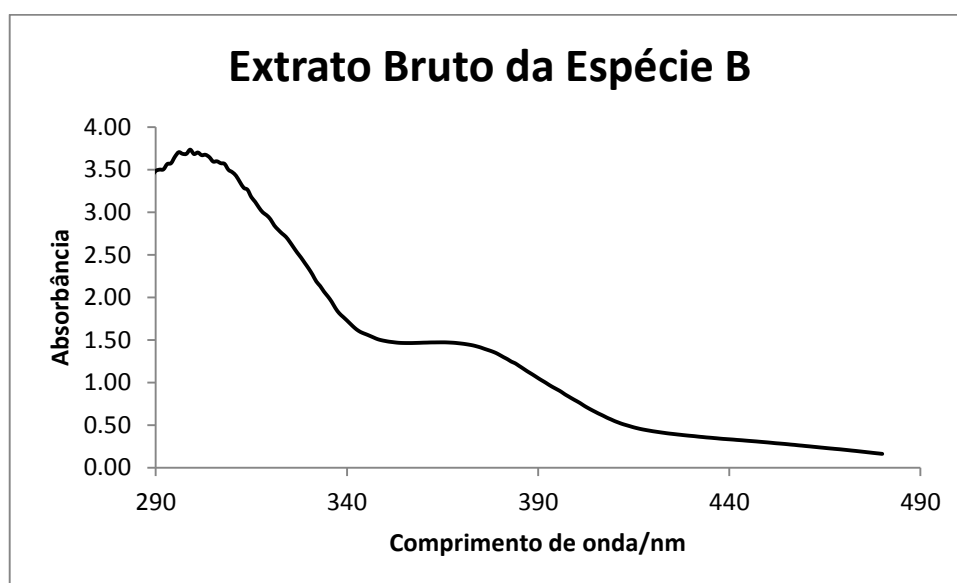


Figura 5. 15- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie B.

A primeira fração extraída da espécie B apresentou banda de absorção larga entre 280 e 305 nm, abrangendo boa parte da região UVB. Uma nova banda de absorção inicia-se em 340 nm e começa perder intensidade por volta de 380 nm, cobrindo parte da região UVA.

A fração B2, representada na FIG. 5.15, apresentou comportamento espectral semelhante à fração B1 nos comprimentos de onda iniciais. No entanto, a segunda banda na região UVA perde um pouco de definição, com diminuição da capacidade de

absorção na região compreendida entre 350 e 380 nm. As frações do grupo 3 absorveram apenas na região UVB, sendo que B3 apresentou absorção bem menos intensa que B4. A região de absorção para B3 é de 280 a 290 nm e 280 a 300 nm para B4. O perfil espectral do extrato bruto da espécie B assemelhou-se bastante à fração B1, exceto pela intensidade de absorção, que foi maior no extrato bruto. A primeira banda de absorção vai de 280 a 320 nm, contemplando toda região UVB. A segunda banda, menos intensa, abrange parte da região UVA, compreendida entre 365 e 395 nm.

Os perfis espectrofotométricos das frações e extrato bruto da espécie C estão ilustrados nas FIGS 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19.

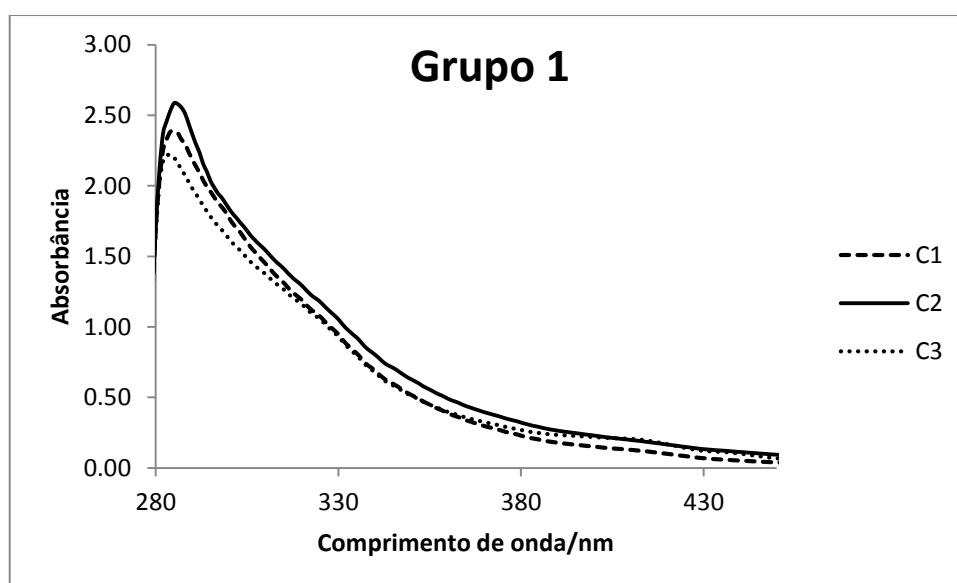


Figura 5. 16- Perfil de absorção das frações C1, C2 e C3 (Grupo 1).

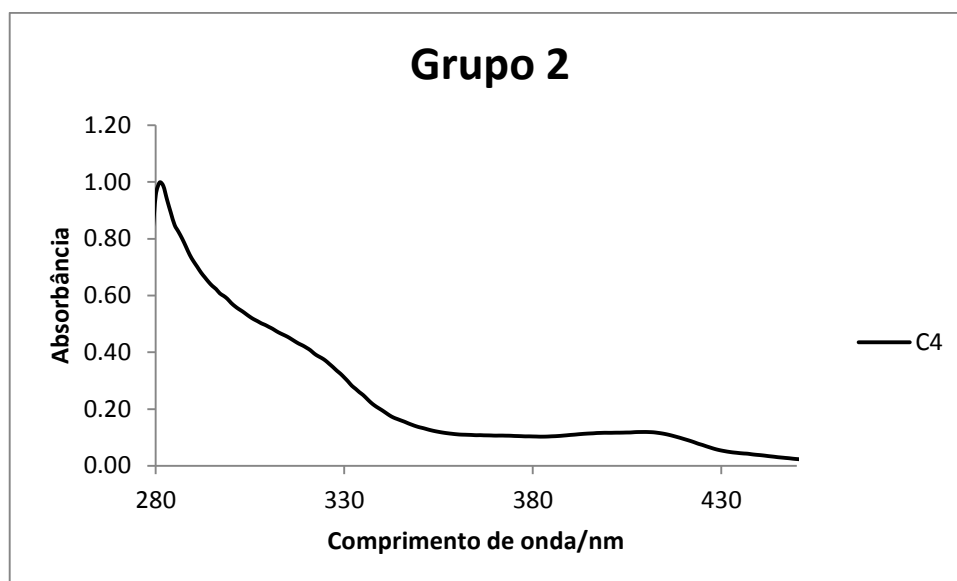


Figura 5. 17- Perfil de absorção da fração C4 (Grupo 2).

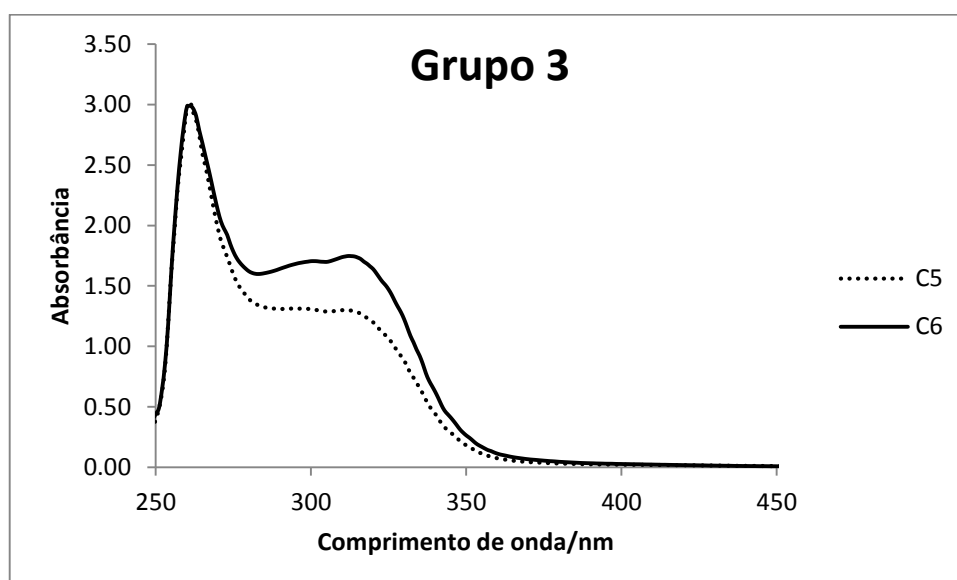


Figura 5. 18- Perfil de absorção das frações C5 e C6 (Grupo 3).

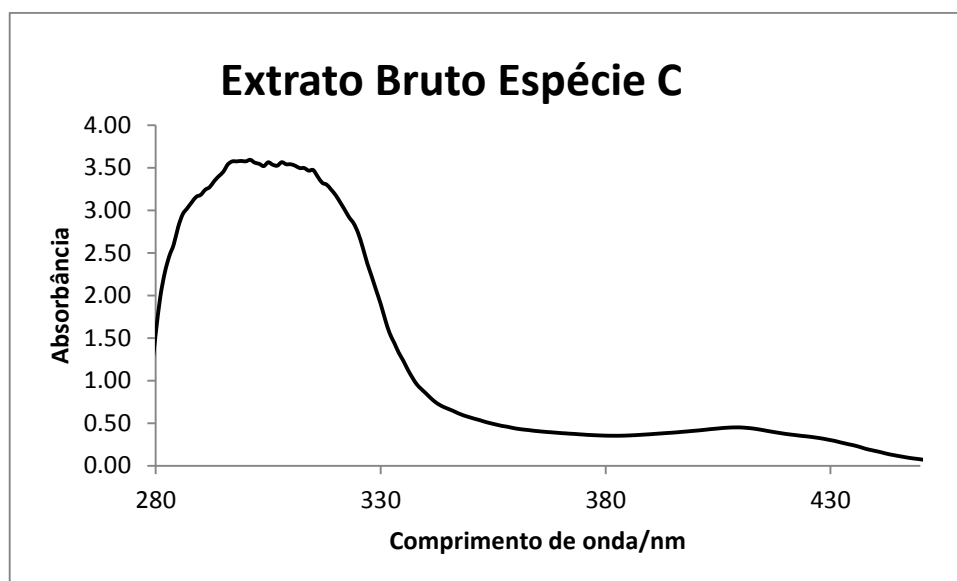


Figura 5. 19- Perfil de absorção do extrato bruto da espécie C.

As frações do Grupo 1 e Grupo 2 da espécie C apresentaram absorção entre 280 e 320 nm, abrangendo toda região UVB. Além da absorção no UVB, a fração C4 ainda apresentou pequena absorção entre 380 e 420 nm, correspondendo a pequena parte da região UVA e violeta do espectro eletromagnético. As frações do Grupo 3 apresentaram absorção em pequena parte da região UVC, 250 a 270 nm. Esses extratos foram os únicos a apresentar absorção na região UVC. As frações ainda obtiveram uma banda larga de absorção que abrange toda região UVB, 290 a 320 nm. No entanto, não apresentou absorção significativa na região UVA. O extrato bruto da espécie C contempla toda região UVB com alta intensidade de absorção. Esse extrato também apresentou pequena absorção na região UVA e parte do violeta.

Em geral, as frações da espécie C não podem ser classificadas com de amplo espectro, pois, não apresentaram absorção na região UVA. Segundo determinação da ANVISA, filtros solares considerados de amplo espectro devem absorver em ambas as faixas de radiação, UVA e UVB. Dessa forma, a utilização das frações da espécie vegetal C em formulações cosméticas só seria viável, se as mesmas fossem incorporadas a outras frações com absorção na região UVA.

5.4 Preparação das formulações fotoprotetoras vegetais

Os três veículos testados para incorporação das frações e extratos vegetais, óleo de Rosa Mosqueta, óleo mineral e gel Natrosol, foram avaliados quanto à capacidade de absorção na região UV e solubilização das frações e extratos brutos vegetais. As FIG.5.20, FIG.5.21 e FIG.5.22 ilustram o perfil de absorção dos três veículos testados acima citados.

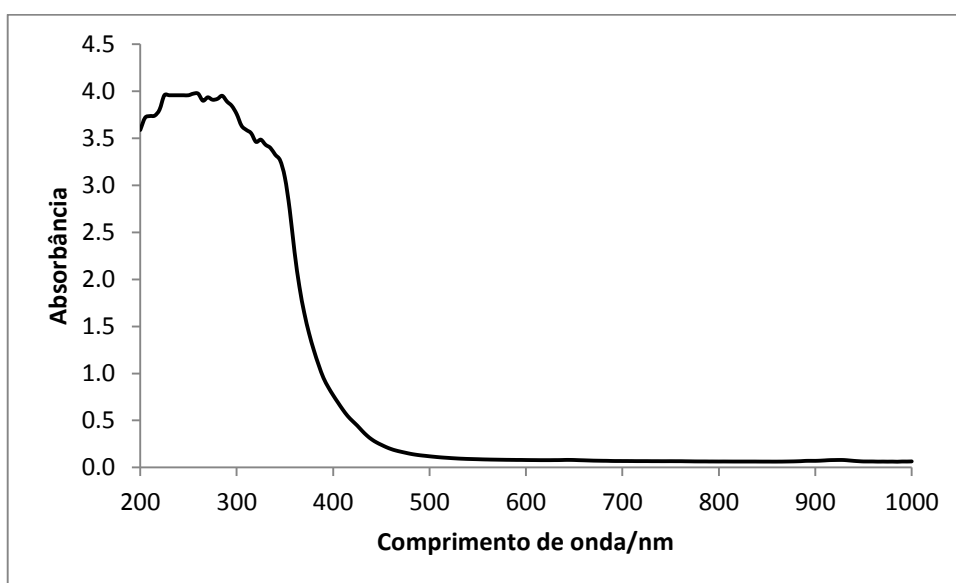


Figura 5. 20- Espectro de absorção do óleo de Rosa Mosqueta

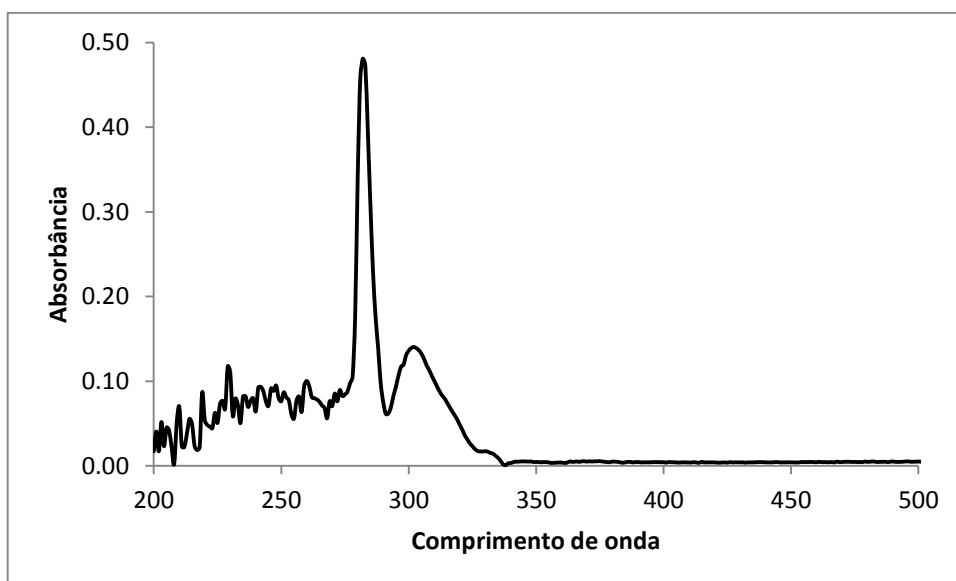


Figura 5. 21- Espectro de absorção do óleo mineral

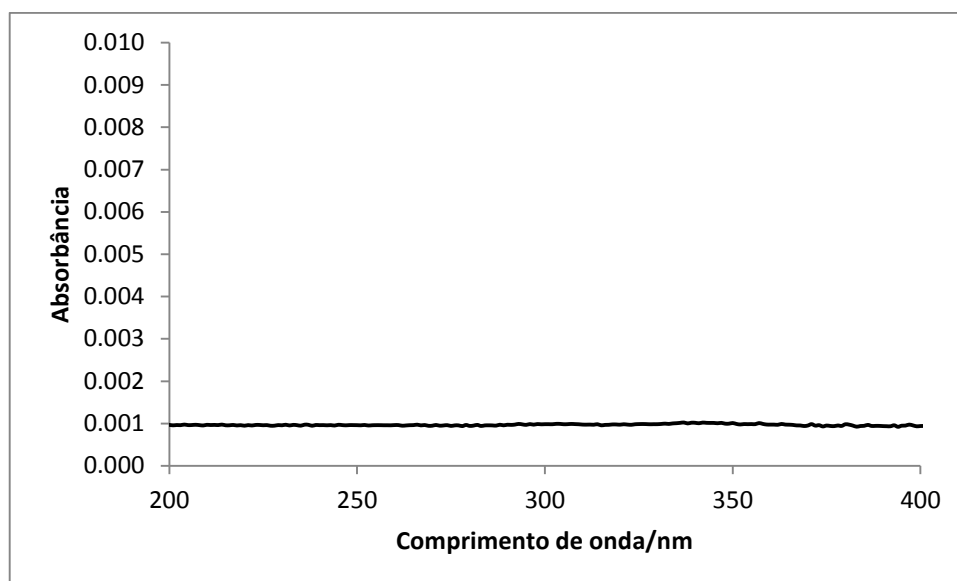


Figura 5. 22- Espectro de absorção do gel Natrosol 1% m/m em água.

O óleo de Rosa Mosqueta e o óleo mineral apresentaram absorção na região UV. A utilização de veículos que apresentam absorção nessa região, apesar de ser uma vantagem, não é indicado a sua utilização, uma vez que pode influenciar os resultados e levar a valores superestimados de proteção contra radiação UV, pois a utilização desses óleos poderia intensificar a ação protetora dos extratos e frações vegetais.

Quanto à capacidade de solubilização, o único veículo capaz de solubilizar as frações e extratos vegetais foi o gel Natrosol em água. Dessa forma, os testes seguintes foram realizados em uma formulação de Natrosol 1% m/m em água com 9% da fração ou extrato bruto vegetal. A escolha da proporção utilizada foi anteriormente discutida no item 4.2.8.

5.4 Determinação do Comprimento de onda crítico e FPS *in vitro* das frações e extratos brutos

Os protetores solares devem ser suficientemente eficazes contra as radiações UVB e UVA a fim de assegurarem um elevado nível de proteção. Portanto, a proteção contra as radiações UVA e UVB deve estar interligada. Além de apresentar um alto valor de absorção, o produto deve ainda apresentar um espectro de absorção amplo, contemplando a maior parte possível da região correspondente à radiação UV. Quanto mais elevado o FPS e maior o λ_c , mais eficaz é o filtro solar.

Para assegurar ampla proteção, a ANVISA exige um comprimento de onda crítico de pelo menos 370 nm. O comprimento de onda crítico é o comprimento que corresponde a 90% da integral da curva de absorção (área sob a curva) entre os comprimentos de onda 290 a 400 nm. Na prática, determina o ponto correspondente àquele a partir do qual o filtro passa a promover uma proteção eficiente (ANVISA, 2012). Entre as 20 frações e 3 extratos brutos analisados, 17 apresentaram $\lambda_c > 370$ nm.

No Tabela 5.10 estão os valores obtidos para o λ_c e FPS *in vitro* pelo método de Mansur das frações e extratos brutos das 3 espécies vegetais.

Tabela 5. 10- Dados de comprimento de onda crítico e FPS das frações e extratos brutos

Fração	λ_c	FPS
Extrato bruto A	371	6,04
A1	378	0,12
A2	386	0,61
A3	389	0,98
A4	383	1,82
A5	389	0,75
A6	385	0,90
A7	373	3,22
A8	377	3,34
A9	375	0,81
Extrato bruto B	379	5,93
B1	378	3,01
B2	382	4,34
B3	382	0,19
B4	382	1,42
Extrato bruto C	396	5,74
C1	362	2,65
C2	368	2,78
C3	368	2,49
C4	373	0,82
C5	339	3,11
C6	340	3,73

A FIG 5.23 ilustra o espectro de absorção da fração A8 da espécie A em que o comprimento de onda crítico é de 377 nm está de acordo com o valor determinado pela ANVISA. A FIG. 5.24 ilustra o espectro de absorção da fração C3 da espécie C de comprimento de onda crítico 340 nm, valor abaixo do exigido pela ANVISA.

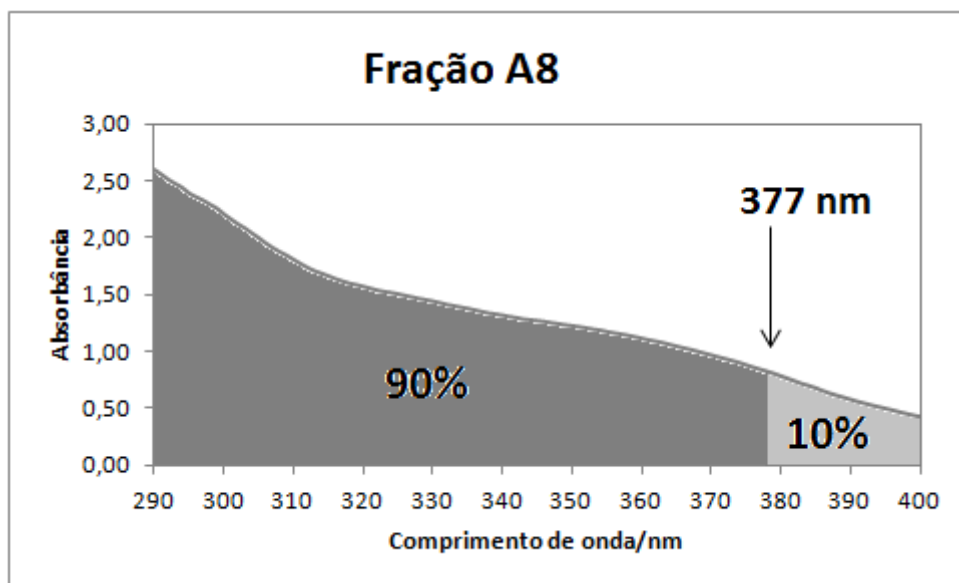


Figura 5. 23- Espectro da fração A8 com $\lambda_c = 377$ nm.

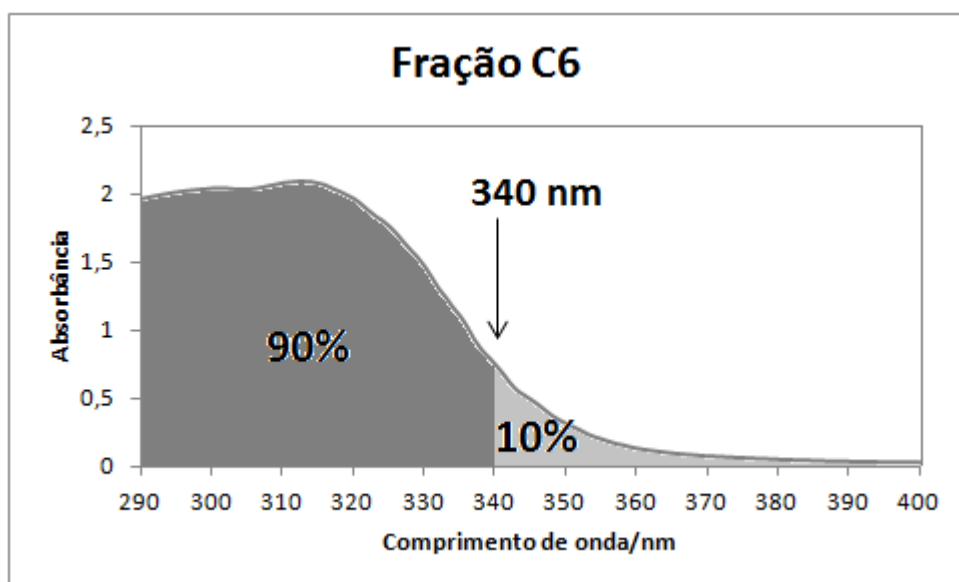


Figura 5. 24- Espectro da fração C3 com $\lambda_c = 340$ nm.

O FPS espectrofotométrico das frações e extratos brutos foi determinado por meio do método desenvolvido por Mansur (MANSUR, 1986). Ao contrário do comprimento de onda crítico, que fornece informações sobre a extensão da faixa de absorção, o FPS caracteriza a amplitude da absorção. Embora a resolução atual da ANVISA (2012) sobre protetores solares exija um FPS de no mínimo 6 para formulações comerciais, há substâncias químicas que funcionam como filtros que apresentam FPS próximo a 3, como o caso do etil - hexil salicilato que em sua concentração máxima (5 %) apresenta FPS 3,2. Portanto, tendo como base o FPS de filtros disponíveis no mercado, o critério

utilizado para decidir se uma fração ou extrato pode ser utilizado para fotoproteção é apresentar $FPS > 3$. Entre as frações e extratos brutos analisados, nove apresentaram FPS adequado.

As 7 frações e extratos brutos realçados na Tabela 5.10 são aqueles que apresentaram ambos os critérios para uma efetiva proteção solar (comprimento de onda crítico maior ou igual a 370 nm e FPS maior ou igual a 3), Essas formulações serão utilizados nas etapas posteriores desse trabalho.

5.5 Controle de qualidade das formulações para testes

O controle de qualidade das formulações foi realizado, analisando as características organolépticas quanto ao aspecto, cor e odor do gel. A medida do pH foi realizada por meio de fitas reativas indicadoras de pH (Macherey - Nagel).

As formulações preparadas com o extrato bruto e frações da espécie A apresentaram-se com aspecto homogêneo e consistente, e odor característico. A formulação preparada com o extrato bruto apresentou-se na cor amarelo claro, enquanto as formulações com as frações dessa mesma espécie apresentaram-se incolor. Já as frações e extratos brutos da espécie B apresentaram as mesmas características organolépticas das frações e extratos de A. No entanto, apresentaram coloração amarela intensa. O extrato bruto da fração C apresentou coloração rósea, odor característico e aspecto heterogêneo. O pH das 7 formulações está mostrado na Tabela 51.1.

Tabela 5. 11- pH das formulações com frações e extratos brutos vegetais

Fração/extrato bruto	ExA	ExB	ExC	A7	A8	B1	B2
pH	5,5	6,5	7,0	6,0	6,0	6,5	6,5

As formulações géis de boa qualidade, apresentam pH ideal em torno de 6,0 (VILELA, 2010). Os resultados de pH determinados para as 7 formulações encontraram-se entre 5,5 e 7,0. Os valores podem ser considerados normais, segundo informado na Resolução RDC N° 4 de 2014 para produtos cosméticos.

5.6 Avaliação da capacidade fotoprotetora dos extratos e frações vegetais

5.6.1 Avaliação da proteção contra radiação UV (180 a 400 nm)

Após a validação do método em 5.2.1, as 7 frações e extratos brutos vegetais selecionados em 5.4 foram avaliados quanto a sua capacidade fotoprotetora em um período de duas horas (A FIG 5.25).

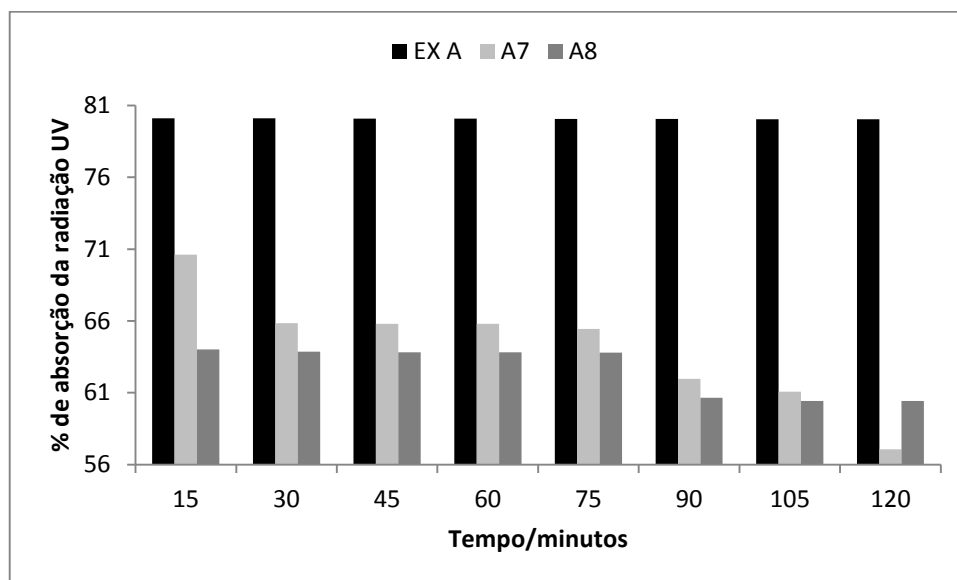


Figura 5. 25– Comportamento frente a radiação UV das frações A7 e A8 e extrato bruto da espécie A no período de 120 minutos.

A capacidade protetora do extrato bruto de A manteve-se praticamente constante durante o período de 2 horas, com porcentagem de absorção da radiação UV média de $80,08 \pm 0,02$ % e decaimento da proteção de 0,08 %. Valor muito menor que aqueles encontrados para as formulações protetoras comerciais.

No entanto, a fração A7 mostrou-se instável à radiação. Essa fração teve seu percentual de proteção diminuído em cerca de 20 % em relação à proteção nos primeiros 15 minutos de teste.

A fração A8 manteve-se estável até os primeiros 75 minutos e após esse tempo, obteve uma queda de 5 % na proteção e, novamente manteve estabilidade em cerca 60 % de absorção da radiação UV.

As frações e extrato bruto da espécie B mostram-se estáveis no período de 2 horas de irradiação, mantendo mais de 90 % da proteção no período analisado. A FIG

5.26 ilustra o comportamento frente a radiação UV do extrato bruto e frações da espécie B.

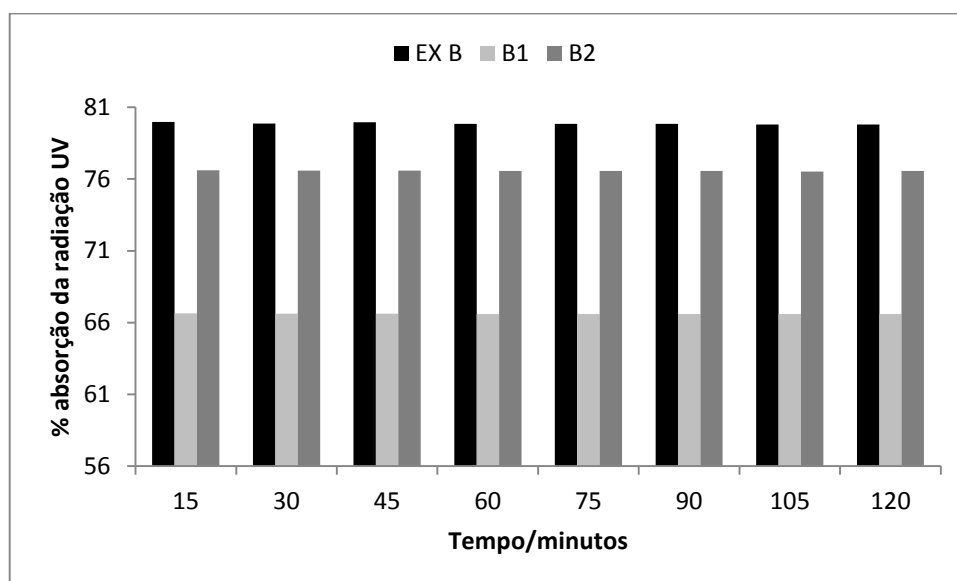


Figura 5. 26– Comportamento frente a radiação UV das frações B1 e B2 e extrato bruto da espécie B no período de 120 minutos.

O extrato bruto da espécie C também foi analisado e seu comportamento frente da radiação UV encontra-se ilustrado na FIG 5.27.

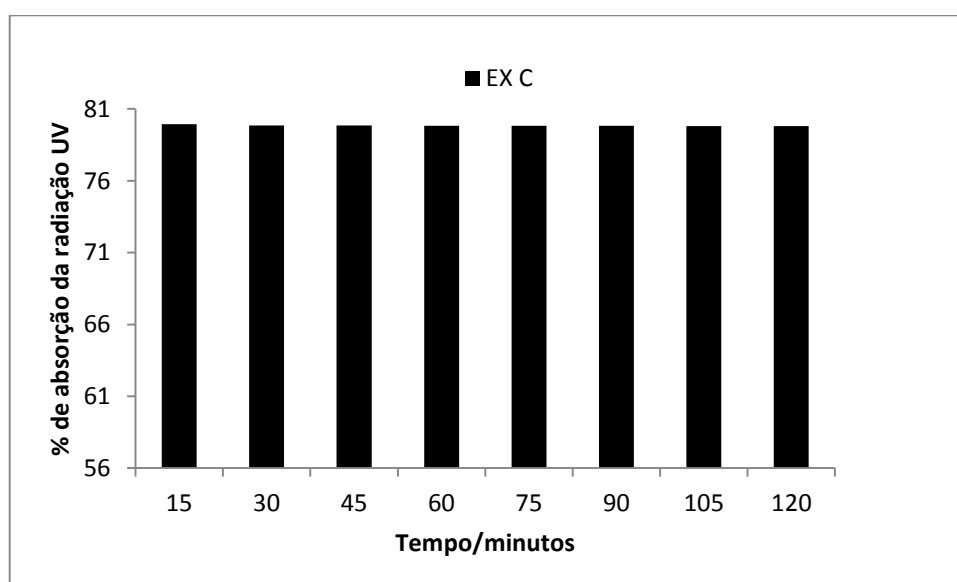


Figura 5. 27– Comportamento frente a radiação UV do extrato bruto da espécie C no período de 120 minutos.

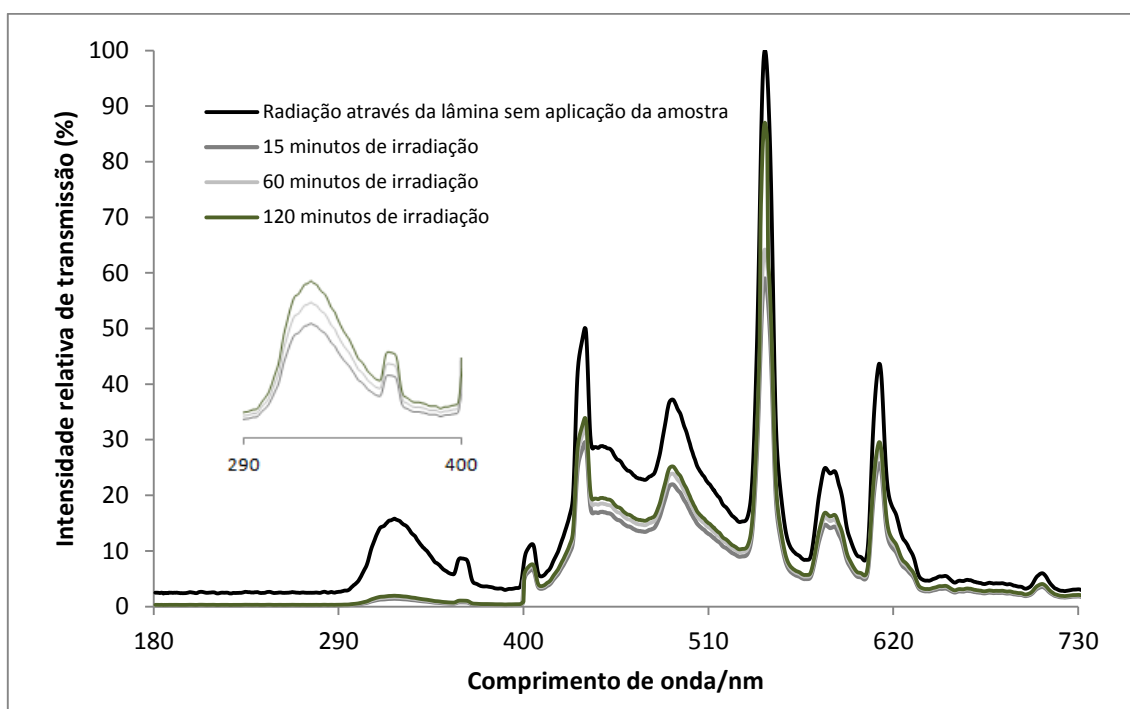
Assim como os extratos brutos de A e B, o extrato bruto de C manteve-se estável no período de 2 horas de irradiação. Apresentando uma variação de apenas 0,16 % da capacidade protetora inicial em relação à final. A Tabela 5.12 sumariza os dados obtidos para as frações e extratos brutos vegetais das três espécies estudadas.

Tabela 5. 12– Dados de proteção contra radiação UV obtidos para frações e extratos brutos vegetais.

Fração/Extrato Bruto	% de proteção média contra radiação UV	% de decaimento da proteção ao longo de 2 horas
EX A	80,1 ± 0,1	0,1
A7	64,2 ± 4,1	19,2
A8	62,6 ± 5,6	5,6
EX B	79,8 ± 0,1	0,2
B1	66,6 ± 0,1	0,1
B2	76,6 ± 0,1	0,1
EX C	79,8 ± 0,2	0,2

Embora a capacidade de proteção média das frações e extratos vegetais seja menor em relação aos protetores solares comerciais, as formulações preparadas com os extratos vegetais e frações das três espécies analisadas apresentaram, de modo geral, a vantagem de serem relativamente mais estáveis que as formulações fotoprotetoras comerciais. A FIG.5.28 ilustra os espectros de transmissão da radiação UV nos tempos de 15, 60 e 120 minutos do protetor comercial P6 e da formulação preparada com o extrato bruto da espécie vegetal B. Ambas as figuras apresentam um “zoom” na área entre 290 a 40 nm, região correspondente à radiação UVA e UVB.

(a)



(b)

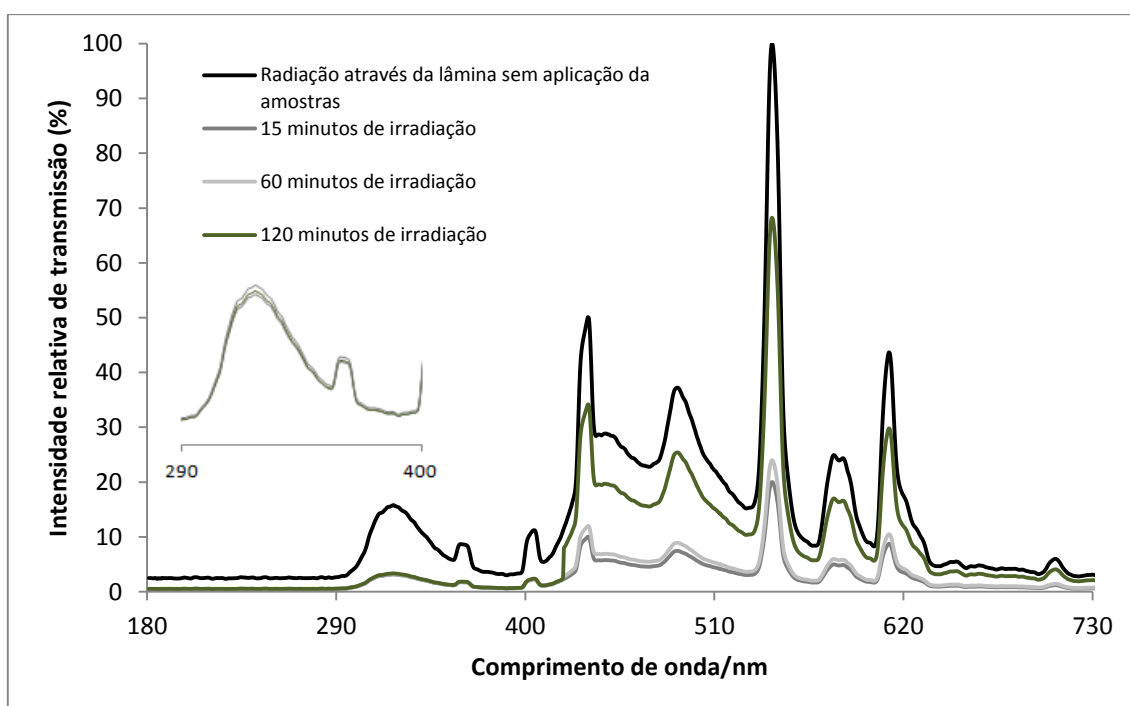


Figura 5. 28 - Espectros de transmissão da radiação UV do protetor comercial P6 (a) e da formulação preparada com o extrato bruto da espécie vegetal B (b) nos tempos de 15, 60 e 120 minutos. As figuras mostram que embora a capacidade de bloquear a radiação UV do protetor P6 ser maior, esse perde a mesma capacidade de proteção de forma mais acentuada que a formulação preparada com o extrato bruto da espécie B.

Enquanto os produtos comerciais apresentaram porcentagem de decaimento da proteção médio em torno de 4 %, as formulações naturais não ultrapassaram 1 %, com exceção das frações da espécie vegetal A. Isso demonstra a estabilidade superior das formulações vegetais em relação as formulações comerciais. Esse fato pode ser explicado devido à capacidade que as plantas têm de se protegerem contra a radiação solar. Ao longo do ano, as espécies enfrentam diferentes intensidades de radiação solar por longos períodos e é de se esperar que as mesmas desenvolvam mecanismos de proteção para evitar danos às suas células (ABURJAI, 2003).

A presença de compostos ativos naturais estáveis frente à radiação UV é um ponto muito importante a ser considerado no processo de preparação de formulações fotoprotetoras. Muitas vezes, a estabilidade dos produtos é comprometida devido à necessidade de obtenção de um FPS elevado. Aumentando a quantidade de filtros na fórmula, aumenta-se o valor do FPS e consequentemente, dificulta a obtenção de formulações estáveis (RIBEIRO, 2006). Por isso, uma das maiores preocupações dos formuladores em relação aos fotoprotetores é a pesquisa de métodos para aumentar o FPS sem aumentar a quantidade de filtro solar, tornando o produto mais barato e com maior estabilidade (MILESI, 2002).

5.6.2 Avaliação da proteção contra radiação UVB (290 a 320 nm)

Uma vez averiguada a estabilidade das frações e extratos brutos, a capacidade de absorção da radiação UVB dos mesmos também foi determinada segundo a metodologia validada em 5.2.2 e comparada com a metodologia de Mansur em 5.4. A FIG 5.29 compara os valores de FPS obtidos pelos dois métodos.

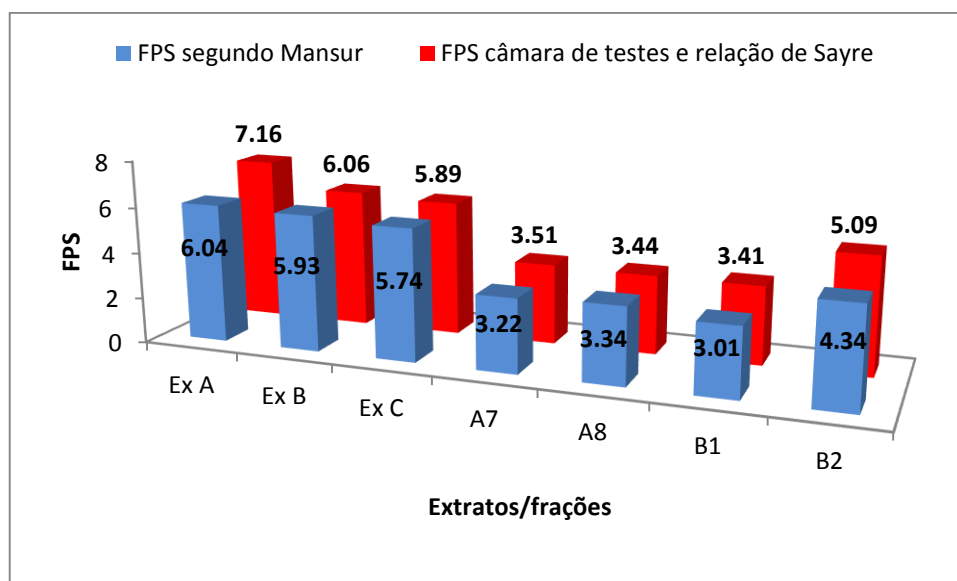


Figura 5. 29– Comparação entre os métodos de Mansur e metodologia da câmara de testes e relação de Sayre.

A metodologia descrita por Mansur já foi comparada a testes *in vivo*, por Santos e colaboradores (1999) e os valores divergiram em no máximo 8% entre as metodologias. Comparando os valores obtidos pela câmara de testes e o método de Mansur, observa-se uma diferença máxima de cerca de 15% entre as duas metodologias. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou os 2 tratamentos mencionados ($P > 0,05$, $P = 0,5956$), o que nos permite dizer que a eficiência dos dois protocolos se equivalem.

Os resultados obtidos demonstraram que as frações puras quando analisadas pela sua capacidade fotoprotetora, apresentaram baixos FPS. De acordo com a legislação brasileira, RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012 (BRASIL, 2012), um produto para ser utilizado em cosméticos fotoprotetores, deve apresentar FPS de no mínimo 6. Desta forma, não se justificaria a incorporação isolada das frações analisadas nestas preparações. De acordo com Cabral (2011), os filtros solares naturais apresentam absorção consideravelmente baixa, o que se confirma pelos dados obtidos no presente estudo. O recomendado é a utilização das frações vegetais como coadjuvantes aos filtros sintéticos. Valores baixos de FPS em frações vegetais já foram encontrados em outros estudos, como no realizado por Souza et al. (2005), que avaliou a atividade fotoprotetora de frações das folhas e flores da *Achillea millefolium* L. As absorbâncias encontradas na faixa de fotoproteção foram muito baixas, sendo as frações não efetivas para o preparo de um produto fotoprotetor. Os resultados obtidos neste estudo podem

ser justificados pelo o que foi exposto por Violante et al. (2009), que sugere o FPS baixo devido a baixa concentração de moléculas com capacidade de absorver a radiação UV. Porém, segundo determinação da ANVISA, três formulações vegetais presentes nesse estudo estariam aptas a serem comercializadas com FPS mínimo exigido sem incorporação de nenhum outro filtro. Os extratos brutos de A, B e C encontram-se nessas condições. No entanto, extratos brutos vegetais, por serem uma mistura complexa de moléculas ativas e menos ativas apresentam certa dificuldade da determinação da absorção máxima dos compostos fotoabsorvedores de radiação UV, além de representar grande possibilidade de ocorrência de alergias (SOUZA et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais desse trabalho, foi possível concluir que:

- A câmara de testes mostrou-se favorável para a realização dos testes de fotoproteção, pois manteve a temperatura em seu interior praticamente constante durante o período de duas horas. Além disso, o valor da iluminância média dentro da caixa está dentro da faixa de valores estipulados pela FDA para testes *in vivo*.
- Os valores de FPS obtidos pela metodologia da câmara de testes e relação de Sayre não apresentaram variações significativas. Portanto, a nova metodologia mostrou-se eficaz para a determinação do FPS, *in vitro*, de amostras fotoprotetoras comerciais.
- Um total de 19 frações purificadas, por meio da coluna cromatográfica, foram obtidas.
- De modo geral, as frações e extratos brutos vegetais das espécies vegetais A e B, apresentaram amplo espectro de absorção da radiação UV. No entanto, as frações da espécie vegetal C apresentaram absorção, apenas na região UVA.
- Entre os 22 extratos brutos e frações analisados, 17 apresentaram comprimento de onda crítico satisfatório. Ainda entre os 22 extratos brutos e frações analisados, nove apresentaram $FPS \geq 3$ segundo o método de Mansur.
- Apenas 7 formulações vegetais apresentaram ambos os critérios para serem utilizadas para fotoproteção.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos para as formulações vegetais pelos dois métodos analisados, metodologia segundo Mansur e metodologia da câmara de testes. Sendo possível dizer que a metodologia da câmara de testes mostrou-se eficiente para determinação do FPS de formulações preparadas com frações e extratos brutos vegetais.
- Considerando o intervalo permitido pelas agências regulamentadoras seguidas pela ANVISA, as três formulações preparadas com extratos brutos vegetais apresentaram FPS mínimo ($FPS \geq 6$) para comercialização sem acréscimo de nenhum outro filtro.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São sugestões para trabalhos futuros relacionados a este trabalho:

- Avaliar e determinar a estabilidade e o FPS das formulações vegetais em diferentes temperaturas.
- Automatizar e validar o processo de extração das frações vegetais por meio do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC).
- Caracterizar as frações e extratos brutos vegetais quantificando o teor de compostos capazes de absorver ou dissipar a radiação UV, como teor de flavonoides, antocianinas e compostos derivados do ácido cinâmico (RAMOS, 2010).
- Observar diferenças nos extratos obtidos a partir de lotes diferentes das espécies utilizadas.
- Testar novos veículos para incorporação das frações e extratos brutos vegetais, tais como sprays, cremes, formulações água/óleo e óleo/água.
- Testar novas concentrações de frações e extratos brutos vegetais em diferentes veículos.
- Projetar um recipiente para analisar formulações de menor viscosidade e de difícil fixação da lâmina atualmente utilizada.
- Combinar frações de espécies vegetais diferentes, a fim de se obter elevação do fator de proteção solar. Além disso, combinar frações que foram reprovadas em um dos testes de comprimento de onda crítico ou de valor de FPS (segundo método de Mansur) com outras frações com o intuito de potencializar a atividade fotoprotetora seja ampliando o espectro de absorção com o aumento do λ_c ou com o aumento da amplitude de absorção pelo FPS.
- Desenvolver formulações de frações e extratos brutos vegetais em combinação com filtros orgânicos sintéticos já conhecidos a fim de potencializar o efeito fotoprotetor dos mesmos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. Plants used in cosmetics. *Phythoter*, v.17, p. 987-1000, 2003.

ALVAREZ, A.M.R.; RODRÍGUEZ, M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y aceites*. v. 51, p. 74-96, 2000.

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

AQUINO, R.; MORELLI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, A.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J Ethnopharmacol.*, v.79, n.2, p.183-191, 2002.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Scientia Plena*, Sergipe, v. 4, n. 11, 2008.

BATCHELDER, R.J.; CALDER, R.J.; THOMAS, C.P.; HEARD, C.M. In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*. *Int J Pharm.*, v.283, n.1-2, p.45-51, 2004.

BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira; ETO, Yukiko; ITAYA, Masayuki. *Formulário médico-farmacêutico*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 522-553, 2000.

BECHELLI, L.M.; CURBAN, G.V. *Compêndio de dermatologia*. 4. ed. São Paulo, p. 588, 1975.

BÉLGICA – The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA). *Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility*, 1997. Disponível em: <http://www.colipa.com> Acesso em 17 de dezembro de 2014.

BRASH, D.E. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet.*, v.13, p. 410- 414, 1997.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos – Resolução RE no 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>> Acesso em 21 de setembro de 2014.

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em 17 de dezembro de 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Diário oficial da República federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, p.52, 2004.

BRASIL. Resolução – RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 4 jun. 2012.

CABRAL, Lorena Dias da Silva; PEREIRA, Samara de Oliveira Pereira; PARTATA, Anette Kelsei. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v. 4, n. 3, 2011.

CAROL H. COLLINS, GILBERTO L. BRAGA, PIERINA S. BONATO, *Fundamentos de Cromatografia*, Editora Unicamp, Campinas, 2006.

CFR - Code of Federal Regulations Title 21- disponível em <<http://www.accessdata.fda.gov>> 12 de Janeiro de 2015.

CTFA AS, COLIPA, JCIA, CTFA –USA. Internatinal Sun Protector Factor Test Method. Maio, 2006

CUMPELIK BM. Analytical procedures and evaluation of sunscreen. J Soc Cosmet Chem, n. 23, p. 333, 1972.

DAL'BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. Skin Res Technol., v.12, p.241- 246, 2006.

DAL'BELO, Susi Elaine. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e Ginkgo biloba. 2008. 192f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KHURY, E.; SOUSA, E. B. Protetores Solares. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, v. 22, p.66-78, nov./dez. 2010.

DIFFEY BL., OAKLEY AM. The onset of ultraviolet erythema. v. 116, Issue 2, p. 183–187, February 1987.

DIVISÃO DE SATÉLITES E ESTUDOS AMBIENTAIS - disponível em <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/> acesso 12 de Janeiro de 2015.

ELMETS, C.A; SINGH, D.; TUBESING, K.; MATSUI, M.; KATIYAR, S.; MUKHTAR, H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.*, v.44, n.3, p.425-432, 2001.

Enciclopédia de Absorvedores de UV para Produtos com Filtro Solar; Cosmet. Toil. (Ed. Port.), v.7, p.47, 1995.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, v.19, p.56-72, 2003.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. *J Am Acad Dermatol*, v. 58, n. 5, p.133-138, 2008.

FULLERTON, A.; FISCHER, T.; LAHTI, A.; WILHELM, K.P.; TAKIWAKI, H.; SERUP, J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema: a report from standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, v.35, p.1-10, 1996.

GASPAR LR, CAMPOS PM. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. *Int J Pharm.*, v.343, n.1-2, p.181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. *IFSCC Magazine*, v.6, n.3, p. 213-217, 2003.

GOMES, A. L.; LANGER, C.M.; OLIVEIRA, E. C.; VAIOLETTTO, L. Diferentes tipos de pele: diferentes necessidades cosméticas. In: Congresso Nacional de Cosmetologia, 12, São Paulo, 1998. *Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Cosmetologia*, p.220-231, 1998.

GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

GREITER, F. Sun protection factor-development methods. *Parf Kosm*, v. 55, p. 55-70, 1974.

Groves GA, Agin PP, Sayre PM. In vitro and In vivo methods to define sunscreen protection. *Australas J Dermatol*, v. 9, p.20-112, 1979.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.*, v.55 p.S49-52, 1997.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.*, v.16, n.6, p.845-850, 1994.

HANGAY, G.; KELEN, A. Improvement of skin condition by herb-extracts and their complexes. In: IFSCC Congress, Edinburgh, Escócia. *Anais*, 2002.

HEINRICH, U.; NEUKAM, K.; TRONNIER, H.; SIES, H.; STAHL, W. Long-term ingestion of high flavanol cocoa provides photoprotection against UV-induced erythema and improves skin condition in women. *J Nutr.*, v.136, n.6, p.1565- 1569, 2006.

HENNE, W. In vivo determination of the sunscreen factor of cosmetic preparations, history and the present state of art. *Parf Kosm*, v.64, p. 415-423, 1983.

HENNESSY, A.; OH, C.; REES, J.; DIFFEY, B. The photoadaptive response to ultraviolet exposure in human skin using ultraviolet spectrophotometry. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, v.21, n.5, p.229-233, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, Radiação UV e saúde humana. Disponível em : < http://satelite.cptec.inpe.br/radiacao/#/radiacao_uv_vis.jsp>. Acesso em 14 de agosto de 2014.

ISAAC, V. L. B., et al.. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Rev. Ciên. Farmac. Básica Apl., v.29, n.1, p.81-96, 2008.

KHURY, E.; SOUSA, E. B. Protetores Solares. Cosmetics & Toiletries, São Paulo, v. 22, p.66-78, nov./dez. 2010.

LLOYD R. SNYDER, JOSEPH J. KIRKLAND, JONH W. DOLAN, Introduction to modern Liquid Chromatography, Wiley Publication, 2009.

MACHADO, J. K. F. B. et al. Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos (ormosil) obtidos por sol-gel com potencial uso como filtro solar. Química Nova. v. 34 (6), p. 945- 949, 2011.

MANSUR IS. BREDER MNR. D'ASCENÇÃO MANSUR MC, AZULAY RD - Determinação do fator de nproteção solar por espectrofotometria. An bras Dermatol, 61: 121-124. 1986 e Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. An bras Dermatol, v. 61, p. 167-172, 1986.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S.. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. Caderno de Farmácia, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p.81-87, 2002.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S.. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. Caderno de Farmácia, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p.81-87, 2002.

MOYAL, D. How to measure UVA protection afforded by sunscreen products. Expert Rev Dermatol, v.3 (3), p. 307-13, 2008.

MOYAL, D., CHARDON A., KOLLIAS, N., Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point (Part 1) Calibration of the method, Photodermatol Photoimmunol Photomed; v. 16, p. 245-249, 2000.

NAKAGAWA, Y.; WAKURI, S.; SAKAMOTO, K.; TANAKA N. *The photogenotoxicity of titanium dioxide particles*. Mutat Res. v. 394, p. 125-32, 1997.

NASCIMENTO, C.; NUNES, L.; LIMA, A.; JUNIOR, S.; NETO, P.; Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. Rev. Bras. Farm., v. 90(4), p.334-339, 2009.

NEVES, K. Testes de eficácia: é o que caracteriza o produto. Cosm. Toil. n.3, p.18-23, 2008. Como formular protetores solares. Cosm. Toil. n.3, p. 24-30, 2008.

OLSON RL., SAYRE RM., EVERETT MA. Effect of anatomic location and time on ultraviolet erythema. Arch. Dermatol, v.5, p. 93 211-5. 1966.

OriginPro 2015 (64-bit), Northampton, MA, USA.

OSTEWALDER U., LUTHER H., HERZOG B., Cosmetics & Toiletries, (Ed. Port.), 2000.

PALM, D. O'DONOGHUE, Update on photoprotection. Dermatol Ther, v. 20, p. 360-376, 2007.

PAVIA, L.; LAMPMAN, M.; KRIZ, S.; Introduction to Spectroscopy – A guide for students of organic chemistry. Second edition, 1996.

PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. Curr. Probl. Dermatol, v.12 (6), p. 287-290, 2000.

POLONINI, H.; RAPOSO, N., BRANDÃO,M.. Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção do câncer de pele. Revista de Atenção Primária a Saúde, Juiz de Fora, v. 14, n. 2, p. 216-223, 2011.

PROSERPIO, G. Cosm. & Toil, v. 91(3), p. 34-46, 1976.

RAMOS, M.F.S.; SANTOS, E.P.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M. Avaliação da atividade antissolar e estudos preliminares de fotodegradação da própolis. Revista Fitos, São Paulo, v. 5, n. 03, 2010.

REETH, I.V. Beyond skin feel: innovative methods for developing complex sensory profiles with silicones. J Cosmet Dermatol, v. 5, p.61-67, 2005.

RIBEIRO, Claudio de Jesus. Fotoproteção e Fotoprotetores. Cosmetologia Aplicada a Dermoestética. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal, 2ª Edição, FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002.

SANTOS, E.; FREITAS Z. M.; SOUZA K.; GARCIA S. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int J Cosm Sci*, v. 21(1), p. 1-5, 1999.

SANTOS, J. S. Antioxidantes de origem vegetal em cosméticos. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, v. 22, p.46-52, mai./jun. 2010.

SAVIAN, A.; VARELLA, F.; ATAHYDE, M.; SILVA, C.; Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. *Rev. Bras. Farm*, v. 91(2), p.82-8, 2011.

SAYRE RM, AGIN PP, LEVEE GJ, MARLOWE E. A comparison of In Vivo and in Vitro testing of suncreening formulas. *Photochem photobiol*, v.29, p. 559, 1979.

SAYRE, R.; STANFIELD, J.; BUSH, A.; LOTT, D.; Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, v.17(6), p.278, 2008.

SCHULZE R- Einige Versuche and Bemerkungen zum Problem der handelsublichen Lichtschutzmittel. *Parfu Kosm*, v.37, p.365-372, 1956.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. A inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare. *Inorganica Chimica Acta*, v. 360, n. 3, p. 794-802, 2007.

SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.

SOUZA, V. M. de; ANTUNES JUNIOR, D. Ativos dermatológicos. São Paulo: Pharmabooks, p. 107-113, 2008. 5 v.

STANDARDS ASSOCIATION OF AUSTRALIA. Sunscreen Products. Evaluation and Classificatio. AS 2604-83.

STEINER, D.; COSMET. TOIL. (Ed. Port.), v. 10, p. 29, 1995.

URBACH F.; “Geographic pathology of skin cancer The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation with Emphasis on the Skin .Oxford: Pergamon, p. 634-50, 1969

Versão revisada e ampliada Draft Australian Standard for Sunscreen products evaluation and labeling. (2009).

VILELA, P.R.; RAFAEL, J.A.; SILVEIRA, I.A.; FURTADO, K.M.F. Controle de qualidade de formulações cosméticas e tintura – Mãe de Calendula officinalis L. XIV INIC - UNIVAP, São José dos Campos, 2010.

VIOLANTE, I.; SOUZA, I.; VENTURINI, C.; RAMALHO, A.; SANTOS, R.; FERRARI, M.; Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19(2A), p. 452-457, Abr./Jun. 2009

WEE, L.; CHONG T.; QUEE D.; Assessment of skin types, skin colours and cutaneous responses to ultraviolet in an asian population. Photodermatol Photoimmunol Photomed, v. 13; p. 169 – 172, 1998.

ANEXO A

A queimadura, ou eritema, é a principal reação da pele à exposição excessiva aos raios solares. O avermelhamento da pele é resultado do aumento do fluxo de sangue, devido à dilatação dos vasos sanguíneos mais superficiais. Para exemplificar as características do ciclo de uma queimadura solar, tomemos o exemplo de uma pessoa branca durante um “banho de sol” de 20 a 30 minutos próximo ao meio dia, num dia de céu limpo em São Paulo. Neste caso, os primeiros sinais de vaso dilatação ocorreriam logo após os primeiros minutos de exposição. Porém, esses primeiros sinais só poderiam ser observados com instrumentos mais sensíveis que o olho humano (Diffey e Oakley, 1987). De maneira geral, nesta situação, os efeitos visíveis surgem após cerca de 4 hrs da exposição, atingindo seu máximo após 8 a 12h e desaparecendo após 1 ou 2 dias. Períodos maiores de exposição ao Sol, principalmente durante os meses de verão, podem antecipar o aparecimento do eritema, aumentar sua intensidade e prolongar seu período de permanência na pele. Altas doses de R-UV também podem provocar edemas, bolhas e descascamento da pele após alguns dias. Além do tempo de exposição, o fenótipo é outro fator que influencia o aparecimento de queimaduras solares. Indivíduos com a pele mais clara têm maior facilidade para desenvolver um processo eritematoso do que indivíduos morenos ou negros. A cor dos olhos, cor dos cabelos e a presença de sardas também são fatores importantes na determinação da susceptibilidade de um indivíduo às queimaduras solares. Um resumo da influência destas características é apresentado no Quadro 1.

A sensibilidade eritêmica também varia de acordo com a parte do corpo humano. O rosto, pescoço e o tronco são de 2 a 4 vezes mais sensíveis do que os membros (Olson et al., 1966; Urbach, 1969). Essas diferenças anatômicas se referem à quantidade média de energia UV recebida pelo corpo, na vertical, quando em exposição à radiação solar. Outros fatores como a idade, alimentação, condições de saúde, condições atmosféricas (umidade, calor e vento) também exercem influência sobre o desenvolvimento do eritema.

Quadro 1 - Tipos de pele e suas características

Tipo	Reações da pele à radiação solar	Exemplos
I	Sempre se queima, facilmente e de maneira severa (queimadura dolorosa); nunca se bronzeia; a pele sempre se descasca.	Pele muito clara, olhos azuis, sardas, cabelos loiros ou ruivos; a pele não exposta é branca.
II	Geralmente se queima facilmente e de maneira severa (queimadura dolorosa); bronzeamento inexistente ou muito fraco; também descasca.	Pele clara, olhos claros ou castanhos, sardas, cabelos loiros ou ruivos; a pele não exposta é branca.
III	Queima moderadamente e apresenta bronzeamento médio.	Média dos caucasianos; a pele não exposta é branca.
IV	Mínima queimadura, bronzeia-se facilmente e acima da média em cada exposição; geralmente exibe reações de IPD (immediate pigment darkening)	Pessoas com a pele branca ou morena, cabelos e olhos castanhos escuros (mediterrâneos, mongolóides, orientais, hispânicos, etc.); a pele não exposta é branca ou morena.
V	Raramente se queima, bronzeia-se facilmente e substancialmente; sempre exibe IPD	Mulatos e mestiços (ameríndios, índios, hispânicos, etc.)
VI	Nunca queima e se bronzeia abundantemente; sempre exibe IPD	Negros; a pele não exposta é negra

(Adaptado de Diffey, 1987).

ANEXO B

A resolução RDC nº47 de 16 de março de 2006 lista os filtros UV permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumarias no Brasil, bem como a concentração máxima de uso permitida para cada um deles (Quadro 2).

Quadro 2- Lista de filtros solares permitidos no Brasil e suas concentrações máximas.

Substância/Nome comercial	Nomenclatura INCI*	Concentração máxima autorizada (%m/m)
Sulfato de metila de N, N, N- trimetil - 4 - (2, oxoborn - 3 - ilidenometil) anilínio/ Mexoryl SO	Camphor benzalkonium - methosulfate	6%
3, 3' - (1,4 - fenilenodimetileno) bis (ácido 7, 7 - dimetil - 2 - oxo - biciclo - (2.2.1) 1- heptilmetanosulfônico e seus sais/Mexoryl SX	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (e salts)	10 % expresso em ácido
1 - (4 - terc - butilfenil) - 3 - (4 - metoxifenol) proano - 1, 3 - diona (avobenzona)/Parsol 1789, Eusolex 90020, Uvinul BMBM	Butyl methoxy dibenzoyl methane	5%
Ácido alfa - (2 - oxoborn - 3 - ilideno) tolueno - 4 - sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina/Mexoryl SL	Benzylidene camphor sulfonic acid e salts	6 % expresso como ácido
2 - Ciano - 3, 3' - difenilacrilato de 2 - etilexila (octocrileno)/Parasol 340, Eusolex OCR, Uninul N 539T, Escalol 597, Neo Heliopan 303	Octocrylene	10 % expresso em ácido
4 - Metoxicinamato de 2 - etoxietila	Cinoxate	3%
2, - dihidroxil - 4 - metoxibenzofenona	Benzophenone - 8	3%
Antranilato de metila/ Neo Heliopan MA	Methyl antranilate	5%
Salicilato de trietanolamina	Triethyl salicylate	12%
2, 2', 4, 4' Tetrahidroxibenzofenona/Uvinul D 50	Benzophenone - 2	10%

Substância/Nome comercial	Nomenclatura INCI*	Concentração máxima autorizada
Ácido 2- fenilbenzofenona - 5 - sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina/Par sol HS, Eusolex 232, Neo Heliopan Hidro	Phenylbenzyl imidazol sulfonic acid (e sodium, potassium, etc salts)	8%
4 - etoxycinamato de 2 - etilhexila/Parsol MCX, Eusolex 2292, Uvinul MC80, Escalol 557, Neo Heliopan AV, Tinosorb OMC	Octyl (ou ethylhexyl) methoxycinnamate	10%
2 - Hidroxi - 4 - metoxibenzofenona (Oxibenzona)/Eusolex 4360, Uvinul M40, Escalol 567, Neo Heliopan BB, Tinosorb B3	Benzophenone - 3	10%
Ácido 2 - hidroxi - 4 metoxibenzofenona - 5 - sulfônico e seu sal sódio (Sulisobenzona e Sulisobenzona sódica)/Uvinul MS 40, Escalol 577, Uvasorb SS	Benzophenone - 4 (acid) Benzophenone - 5 (Na)	10 % expresso em ácido
Ácido 4 - aminobenzóico	PABA	15%
Salicilato de homomentila/Eusolex HMS, Neo Heliopan HMS	Homosalate	15%
Polímero de N - {(2 e 4)[(2 - oxoborn - 3 - ilideno) metil] benzil} acrilamida/Mexoryl SW	Polyacrylamide dimethyl benzylidene camphor	6%
N - Etoxi - 4 aminobenzoato de etila/Uvinul	PEG - 25 PABA	6 &
4 - Dimetil - aminobenzoato de 2 - etilhexila (Padimate O)/Escalol 507, Eusolex 6007	Octyl (ou ethylhexyl) dimethyl PABA	8%
Salicilato de 2 - etilhexila/Neo Heliopan OS, Escalol 587, Eusolex OS	Octyl (ou ethylhexyl) salicylate	5%
4 - Metoxycinamato de isopentila/Neo Heliopan E1000	Isoamyl p - methoxycinnamate	10%
3 - (4' - metilbenzilideno) - d - I - cânfora/Neo Heliopan MBC, Parsol 5000, Eusolex 6300, Uvinul MBC 95	4 - Methyl benzylidene camphor	4%

Substância/Nome comercial	Nomenclatura INCI*	Concentração máxima autorizada
3 - Benzilideno cânfora/Mexoryl SD	3- Benzylidene camphor	2%
2, 4, 6 - Trinilin - (p - carbo - 2' - etil - hexil - 1' - oxi) - 1, 3, 5 - triazina/Uvinul T150	Octyl (ou ethylhexyl) triazone	5%
2 - (2H - benzotriazol - 2 - il) - 4 - metil-6-{2- metil-3-(1,3,3,3- tetrametil-1- ((trimetilsilil)oxi)- disiloxanil) propil} fenol/Mexoryl XL	Drometrizole trisiloxane	15%
Ácido benzóico,4,4'-[[6- [[4-[[[(1,1-dimetil - etil) amino] cabonil] fenil] amino]-1,3,5- triazina-2,4-diil] bis-,bis(2-etilhexil)	Dioctyl (ou diethylexyl) butamidotria zone	10%
2,2' -metileno-bis- 6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametilbutil)-1,1,3,3-fenol Metileno bis-benzotriazolil tetraetil butil fenol/Tinosorb M	Methylene bisbenzotriazon yl tetramethylb utyphen-ol	10%
Sal monossódico do ácido 2,2'-bis-(1,4-fenileno)- 1Hbenzimidazol-4,6-dissulfônico/Neo Heliopan APC	Bisimidazylat e	10% expresso em ácido
(1,3,5)-triazina-2,4- bis{[4-(2-etilhexiloxi)-2- hidróxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil)/Tinos orb S	Anisotriazine	10%
Dimeticodietilbenz almalonato/ Parsol SLX	Polysilicone- 15	10%
Éster helílico do ácido 2-[4-(dietilamino)-2- hidróxibenzoil]-benzóico/ Uvinul A Plus	Diethylamino hydroxy benzoyl hexyl benzoate	
Dióxido de titânio	Titanium dioxide	25%
Óxido de zinco	Zinc oxide	25%

Fonte: Ribeiro, 2006. *INCI: International Nomenclature Cosmetic Ingredients.