UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE FILTROS SOLARES SOBRE A ESTABILIDADE, LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO p-METOXICINAMATO DE OCTILA EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

ANA PAULA LOPES BACAGLINI ZAMBON

ORIENTADORA: PROFª DRª ROSÂNGELA GONÇALVES PECCININI

CO-ORIENTADOR: PROF DR MARCOS ANTONIO CORRÊA

ARARAQUARA -SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE FILTROS SOLARES SOBRE A ESTABILIDADE, LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO p-METOXICINAMATO DE OCTILA EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

ANA PAULA LOPES BACAGLINI ZAMBON

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: PROFª DRª ROSÂNGELA GONÇALVES PECCININI

CO-ORIENTADOR: PROF DR MARCOS ANTONIO CORRÊA

ARARAQUARA – SP
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Z24i

Zambon, Ana Paula Lopes Bacaglini
Influência da associação de filtros solares sobre a estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea do p-metoxicinamato de octila em formulações fotoprotetoras / Ana Paula Lopes Bacaglini Zambon. – Araraquara, 2011
102 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Rosângela Gonçalves Peccinini
Co-orientador: Marcos Antonio Corrêa

1. Filtro solar. 2. Permeação cutânea. 3. Radiação UV. 4. p-metoxicinamato de octila. 5. Estabilidade. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Corrêa, Marcos Antonio, co-orient.. III.Título.

CAPES: 40300005

EPÍGRAFE

"A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...
é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos."

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

À minha família,

que tanto me dão força na realização de todos os meus sonhos, que estão ao meu lado em todos os momentos e o mais importante de tudo que me amam de graça exatamente do jeito que eu sou.

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família." (Léon Tolstoi)

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS que me dá coragem e discernimento para que eu consiga seguir em frente o meu caminho.

Aos meus orientadores Rosângela e Marcos que têm um significado muito maior pra mim, são pessoas nas quais confio muito e que são meus amigos de verdade. Obrigada pelos exemplos que me deram de pessoas humildes e dotadas de um coração enorme e profissionais felizes pelo que fazem e extremamente éticos. Obrigada pela confiança.

Aos meus irmãos Clélio e Élton pela força e paciência, aos meus pais por acreditarem e investirem em mim, à minha sogra Toninha que tanto torce e cuida de mim, e ao meu marido Catuto está ao meu lado em todos os momentos com muita calma e paciência, que me ama de um jeito impressionante e que vibra junto comigo a cada conquista minha. Obrigada meu DEUS por estas pessoas que são o que eu tenho de mais maravilhoso na minha vida.

Aos meus amigos Juliana, Bruna, Letícia, Jemima, Paula, Gabriela, Guilherme, Michel, Tereso, Rodrigo, Marcos, Elias, Berê, Kelly, Hilris, Sandra, Marcão, Simone, Andréia, Maria, Valéria, Ilza, Luciana, Giovanni, Hannah, Flávia, Fernanda, Paula Martini, Priscileila, José Ricardo.

Aos professores Antônio, Thalita, Marlus, Vera, Georgino, Leila, Hérida, Luís.

À professora Drª Maria Vitória Bentley e Fabíola Garcia pelo auxílio nos estudos de permeação e retenção cutânea in vitro realizados preliminarmente nas dependências da faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP de Ribeirão Preto.

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

À Laura, Sônia e Claúdia, secretárias do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP de Araraquara, pela paciência e atenção.

Aos funcionários da Biblioteca e Serviço de apoio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP de Araraquara.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Os raios ultravioletas podem desencadear queimadura solar, fotoenvelhecimento e câncer de pele e, por este motivo, foram desenvolvidos os filtros solares. Atualmente considera-se que uma formulação fotoprotetora ideal e de maior fotoestabilidade deve conter em sua formulação associação de filtros solares com ampla capacidade de absorção da radiação UVB e UVA. Dentre os filtros solares utilizados neste trabalho estão o p-metoxicinamato de octila (OMC), um dos mais utilizados globalmente na proteção frente à radiação UVB, a Benzofenona-3, absorvedor de radiação UVB e UVA II, o Ácido Sulfônico Fenilbenzimidazol, um filtro solar UV-B hidrossolúvel e o Bemotrizinol, com amplo espectro. O sítio de ação desejável de um filtro solar é restrito à superfície da pele e sua função é perdida quando este permeia a pele e atinge a circulação sistêmica. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a permeação e absorção sistêmica de filtros solares através da pele. Este trabalho teve como objetivo avaliar a interferência da associação dos filtros solares benzofenona 3, ácido sulfônico fenilbenzimzidazol e BEMT nos estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do OMC. A metodologia de identificação e quantificação do OMC foi validada, levando-se em consideração a análise dos limites de confiança. Foram realizados estudos de estabilidade preliminar e acelerada das formulações e do OMC em virtude da fotoinstabilidade do mesmo. Os estudos de liberação, permeação e retenção cutânea foram realizados utilizando-se o equipamento de célula de difusão vertical de Franz modificada e as membranas utilizadas foram acetato de celulose para o estudo de liberação e orelha de porco para permeação e retenção cutânea. Os resultados obtidos permitiram concluir que as formulações estudadas apresentaram comportamento de estabilidade e liberação de OMC semelhantes, independente da associação de filtros solares. Além disso, esta associação acarretou diminuição da retenção *in vitro* do OMC

no estrato córneo e aumentou significativamente a permeação *in vitro* do OMC, evidenciando a necessidade da condução de estudos *in vivo* para avaliação dos riscos de absorção significativa do produto que poderiam resultar em efeitos sistêmicos indesejáveis.

Palavras-chave: Filtro solar, permeação cutânea, retenção cutânea, radiação UV, p-metoxicinamato de octila, estabilidade.

ABSTRACT

Ultraviolet rays can cause sunburn, photoaging and skin cancer and, because of this, sunscreens were developed. Currently it is considered that an ideal sunscreen formulation and greater photostability must contain in its formulation association of solar filters with high capacity to absorb UVB and UVA. Among the solar filters used in this work are p-octyl methoxycinnamate (OMC), one of the most globally used in the protection against UVB radiation, Benzophenone-3, UVB and UVA II absorber Fenilbenzimidazol Sulfonic Acid, a UV-B hidrosoluble solar filter and Bemotrizinol with broad spectrum. The desirable site of action of a solar filter is limited to the skin surface and its function is lost when it permeates the skin and reaches the systemic circulation. *In vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the permeation and systemic absorption of solar filters across the skin. This study objective was to evaluate the interference of association of the solar filters benzophenone-3, fenilbenzimzidazol sulfonic acid and BEMT on the stability, release, *in vitro* skin permeation and retention of the OMC. The methodology for OMC's identification and quantification was validated, taking into account the confidence limits analysis. Preliminary and accelerated stability studies of the formulations and the OMC, because of it's photoinstability. The release studies, skin permeation and retention were performed using the equipment Franz's vertical diffusion cell modified, and the membranes used were cellulose acetate for the release study and pig ear skin for permeation and retention. The results showed that the formulations studied showed similar behavior stability and OMC's release, regardless of the association of the solar filters. In adition, this association has decreased the *in vitro* retention of the OMC, in the stratum corneum, and increased, significantly, the *in vitro* permeation of the OMC, showing the the need for conducting *in vivo* studies to assess risks of significant uptake of the

product that could result in undesirable systemic effects.

Keywords: Solar filters, skin permeation, skin retention, UV radiation, octyl methoxycinnamate, stability.

ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEMT: Bemotrizinol

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA: Food and Drug Administration

FPS: Fator de proteção solar

HPLC: Cromatografia líquida de alta pressão

INCI: Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos **IV**: Infravermelho

OMC: Metoxicinamato de octila

PABA: Ácido Paraaminobenzóico

SAXS: Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

UVC: Ultravioleta C

UV: Ultravioleta

Vis: Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro eletromagnético. 19

Figura 2. Penetração das radiações UVB e UVA na pele exposta ao sol. 20

Figura 3. Proteção química e física contra a radiação solar..... 23

Figura 4. Esquema da estrutura molecular do OMC..... 26

Figura 5. Estrutura química da Benzofenona-3..... 27

Figura 6. Estrutura molecular do ácido sulfônico fenilbenzimidazol..... 28

Figura 7. Estrutura química do BEMT (Tinosorb® S)..... 28

Figura 8. Representação esquemática das camadas da pele 29

Figura 9. Orelhas de porco prontas para dissecação (a) e (b) e após dissecação (c)..... 51

Figura 10. Orelhas de porco já dermatomizadas e prontas para o estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea..... 51

Figura 11. Esquema da célula de difusão utilizada nos estudo de permeação e retenção cutânea..... 52

Figuras 12 e 13. Fotos de microscopia da formulação F-B em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente..... 54

Figuras 14 e 15. Fotos de microscopia da formulação F-1 em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente..... 55

Figuras 16 e 17. Fotos de microscopia da formulação F-2 em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente..... 55

Figura 18. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-B. 57

Figura 19. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-1..... 57

Figura 20. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-2. 57

Figura 21. Curva de fluxo das formulações F-B, F-1 e F-2..... 59

Figura 22. Rampa de tensão com limite de escoamento para as formulações F-B, F-1 e F-2. ... 61

Figura 23. Varredura de tensão da formulação F-B. 63

Figura 24. Varredura de tensão da formulação F-1. 63

Figura 25. Varredura de tensão da formulação F-2..... 63

Figura 26. Varredura de freqüência da formulação F-B. 64

Figura 27. Varredura de freqüência da formulação F-1..... 64

Figura 28. Varredura de freqüência da formulação F-2..... 64

Figura 29. Fluência e relaxação das formulações F-B, F-1 e F-2. 65

Figura 30. Cromatograma do OMC..... 66

Figura 31. Cromatograma dos filtros ácido sulfônico fenilbenzimidazol (I), Benzofenona-3 (II) e OMC (III). 67

Figura 32. BEMT não identificado nestas condições cromatográficas durante 50 minutos. 67

Figura 33. Curva analítica de OMC em isopropanol. 68

Figura 34. Curva analítica de OMC em solução receptora. 73

Figura 35. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-1 durante o estudo de estabilidade química preliminar. 83

Figura 36. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-2 durante o estudo de estabilidade química preliminar. 83

Figura 37. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-1 durante o estudo de estabilidade química acelerada. 84

Figura 38. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-2 durante o estudo de estabilidade química acelerada. 84

Figura 39. Representações gráficas dos modelos de cinética de liberação (F-1). 88

Figura 40. Representações gráficas dos modelos de cinética de liberação (F-2). 89

Figura 41. Permeação cutânea do OMC (F-1 e F-2). 90

Figura 42. Estudo de retenção cutânea da formulação F-1. 93

Figura 43. Estudo de retenção cutânea da formulação F-2. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele de acordo com FITZPATRICK (1976)..... 30

Tabela 2. Composição percentual da F-B. 37

Tabela 3. Composição percentual da F-1. 38

Tabela 4. Composição percentual da F-2..... 38

Tabela 5. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (Mansur *et al.*, 1986)..... 48

Tabela 6. Valores de tixotropia e viscosidade aparente mínima (Pa.s) das formulações F-B, F-1 e F-2 (Médias de três leituras e desvio menor que 5%)..... 60

Tabela 7. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão intradia..... 69

Tabela 8. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão interdia. 69

Tabela 9. Concentrações de OMC obtidas variando-se o fluxo nas condições cromatográficas..... 70

Tabela 10. Concentrações de OMC obtidas variando-se a temperatura da coluna nas condições cromatográficas..... 70

Tabela 11. Concentrações de OMC obtidas variando-se a coluna nas condições cromatográficas..... 71

Tabela12. Concentrações de OMC obtidas variando-se o pH da fase móvel (água) nas condições cromatográficas. 71

Tabela 13. Concentrações de OMC obtidas no estudo de recuperação. 72

Tabela 14. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão intradia em solução receptora. 73

Tabela 15. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão interdia em solução receptora. 74

Tabela 16. Valores de pH da F-B durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH)..... 76

Tabela 17. Valores de pH da F-1 durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH). 77

Tabela 18. Valores de pH da F-2 durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH). 77

Tabela 19. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-B (Médias de três leituras de viscosidade)..... 78

Tabela 20. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-1 (Médias de três leituras de viscosidade)..... 78

Tabela 21. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-2 (Médias de três leituras de viscosidade). 79

Tabela 22. Valores de pH da F-B durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH). 80

Tabela 23. Valores de pH da F-1 durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH). 80

Tabela 24. Valores de pH da F-2 durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH). 80

Tabela 25. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-B (Médias de três leituras de viscosidade). 81

Tabela 26. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-1 (Médias de três leituras de viscosidade). 81

Tabela 27. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-2 (Médias de três leituras de viscosidade). 82

Tabela 28. Valores de FPS para a formulação F-1 (Médias de três medidas de FPS) 85

Tabela 29. Valores de FPS para a formulação F-2 (Médias de três medidas de FPS). 85

Tabela 30. Valores obtidos de OMC ($\mu g/cm^2$) no estudo de liberação das formulações F-1 e F-2. Valores expressos como média. 87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
3. OBJETIVO GERAL.....19
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
5. JUSTIFICATIVA 19
6. MATERIAIS E MÉTODOS 20
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES 39
8. CONCLUSÕES 82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

1. INTRODUÇÃO

A exposição excessiva ao sol pode desencadear vários efeitos indesejáveis aos seres humanos. Tais efeitos podem ser atribuídos à radiação ultravioleta (UV) emitida pelo Sol. Esta radiação UV faz parte do espectro eletromagnético e corresponde à faixa de comprimento de onda compreendida entre 100 e 400nm. Esta radiação é subdividida em UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (100-290nm), que estão relacionadas ao envelhecimento precoce, queimadura e câncer de pele. Contudo, a radiação solar é atenuada ao atravessar as camadas atmosféricas, não permitindo que uma parte substancial atinja a superfície terrestre.

A pele constitui uma considerável proteção para a penetração dos raios ultravioleta. Alguns sistemas naturais são capazes de prevenir os danos solares, com a secreção sudorípara (àcido urocânico), a pigmentação (melanina) e a camada córnea (espessamento da epiderme). Todavia apenas estes sistemas naturais de fotoproteção não são capazes de prevenir totalmente os danos solares, sendo necessária a utilização de filtros solares, que são capazes de diminuir a quantidade de radiação que atinge a pele humana, através, por exemplo, de efeitos como absorção e/ou reflexão. Os filtros solares não somente protegem contra a queimadura solar, mas também, em longo prazo, contra danos crônicos à pele, incluindo danos ao DNA celular, e câncer de pele.

Atualmente uma formulação fotoprotetora ideal e de maior fotoestabilidade deve conter em sua formulação associação de filtros solares com ampla capacidade de absorção da radiação UVB e UVA. São produtos com altos índices de proteção com a menor quantidade possível de filtros solares.

Dentre os filtros solares químicos existentes no mercado o p-metoxicinamato de octila, da classe dos cinamatos, é ainda o mais utilizado para proteção UVB. Ele pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros

absorvedores de radiação ultravioleta com o intuito de aumentar o espectro de fotoproteção.

Os filtros solares devem ter como sítio de ação a superfície da pele, não devendo permeá-la, garantindo, assim, a sua função fotoprotetora e a segurança dos consumidores. É importante lembrar que a composição das formulações fotoprotetoras deve limitar a penetração dos filtros solares na pele enquanto garantem boa espalhabilidade e formação de um filme uniforme no momento da aplicação do produto na pele. Apesar disso, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a permeação e absorção sistêmica de filtros solares através da pele, acarretando até mesmo efeitos endócrinos.

Em virtude da necessidade de se avaliar e garantir a segurança destas formulações fotoprotetoras, uma vez que têm sido amplamente utilizadas, maior atenção tem sido dada ao potencial de permeação cutânea de filtros solares e seus subseqüentes efeitos tóxicos.

Tendo em vista todos os aspectos relacionados à necessidade de cosméticos eficientes na proteção solar que possuam estabilidade e segurança de utilização, o presente trabalho propõe a preparação de uma formulação composta por um único filtro solar e outra por associação de quatro filtros solares, além da avaliação de aspectos relacionados à sua estabilidade e segurança considerando a possibilidade de permeação do OMC e conseqüentemente o risco de efeito tóxico sistêmico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A luz solar é fundamental para a manutenção da vida terrestre uma vez que pode trazer sensação de bem estar físico e mental, além de estimular a produção de melanina, com conseqüente bronzeamento da pele, e a síntese de vitamina D, responsável pela absorção do cálcio. Contudo a exposição inadequada à luz solar pode provocar efeitos indesejáveis ao homem, como queimadura solar, fotoenvelhecimento e câncer de pele (CORREA, DAVOLOS e DAVOLOS 2007).

A radiação eletromagnética emitida pela luz solar apresenta largo espectro de comprimentos de onda, e englobam os raios cósmicos e gama, os raios X, ultravioleta, luz visível, infravermelho e ondas de rádio. Esta radiação solar não atinge em sua totalidade a superfície terrestre em virtude dos processos de absorção, dispersão e reflexão que ocorrem na passagem da radiação pelas camadas atmosféricas. A radiação solar alcança a Terra e tem seus comprimentos de onda compreendidos entre 290 e 2000nm, onde estão inclusas as radiações ultravioleta (290 a 400nm), visível (400 a 750nm) e infravermelha (750 a 2000nm). (SANTOS, 1987; EPSTEIN, 1990; ROY *et al.*, 1998). A Figura 1 mostra o espectro eletromagnético.

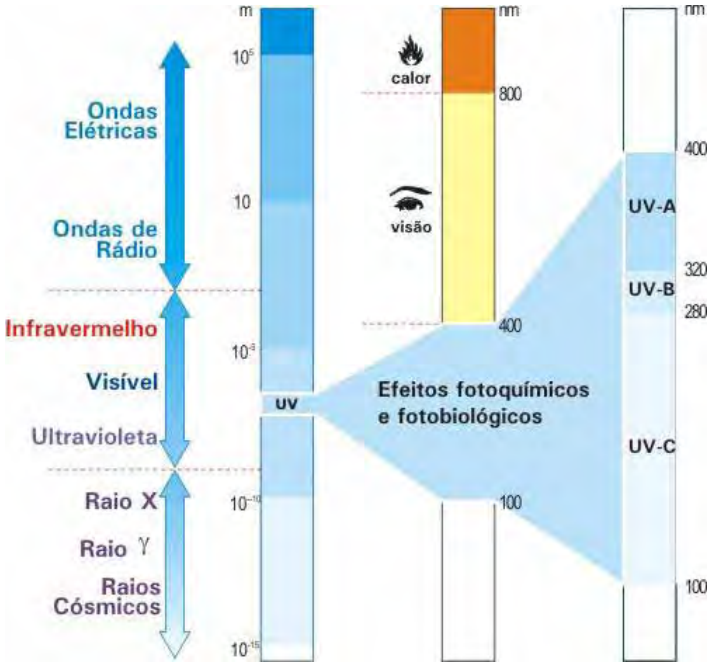


Figura 1. Espectro eletromagnético (Fonte: INPE, 2010).

Os efeitos indesejáveis que a luz solar pode acarretar ao homem estão relacionados principalmente à radiação ultravioleta (UV) (CORREA, DAVOLOS e DAVOLOS 2007).

A radiação UV pode ser dividida em três intervalos, levando-se em consideração suas características de propagação e efeitos biológicos: UVC (100-290 nm) que praticamente não chega à superfície da Terra por ser absorvida pela camada de ozônio, aparentemente bastante perigosa à pele por causa de sua alta energia; UVB (290-320nm) que devido à sua alta energia é responsável pelos danos imediatos da radiação solar, como queimaduras de pele e, em longo prazo, câncer de pele; e UVA (320-400nm), que está relacionada ao bronzeamento da pele, induz alterações celulares e envelhecimento precoce, além de ter maior poder de penetração cutânea (COLEPICOLO, GUARATINI e MEDEIROS, 2007). Além disso, de acordo com a Portaria MS 2.466/2010, a radiação UVA pode ser dividida em UVA II ou curto (320 a 340nm) e UVA I ou longo (340 a 400nm).

Os raios UVA são menos carcinogênicos que os UVB, mas atingem, proporcionalmente, 10 a 100 vezes mais a superfície terrestre (HERBERT, 1983). A Figura 2 mostra o poder de penetração das radiações UVB e UVA na pele exposta ao sol.

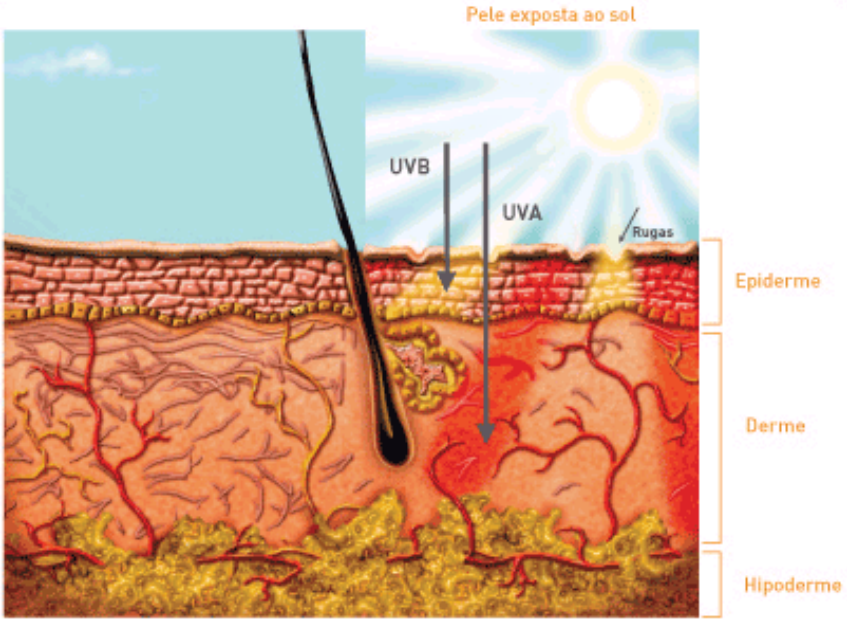


Figura 2. Penetração das radiações UVB e UVA na pele exposta ao sol (L'ORÉAL, 2010).

O comprimento de onda e a dose de radiação ultravioleta à qual a pele é exposta e características intrínsecas do indivíduo exposto, como por exemplo, susceptibilidade genética e pigmentação da pele são importantes para a avaliação das respostas cutâneas a esta radiação (COLEPICOLO, GUARATINI e MEDEIROS, 2007).

O envelhecimento precoce (fotoenvelhecimento) é mediado por citoquinas (SCOTTI & VELASCO, 2003), substâncias que geram resposta ao estresse causado na pele exposta à radiação UV, como a secreção de metaloproteinase-1 da matriz na derme, o que leva à degradação do colágeno e consequente produção de rugas. Como consequência natural do processo de envelhecimento, ou sua causa, essa radiação também danifica diretamente o DNA, causando a formação de dímeros de pirimidina

ciclobutano (CPDs). É de extrema importância que estas lesões sejam reparadas uma vez que podem resultar em morte celular ou mutagênese (GOLDSTEIN, 2008).

Além de danos estruturais à pele, alterando a pigmentação cutânea e os raios ultravioleta (UVA, UVB e UVC) também podem levar à formação de radicais livres que, por serem instáveis devido a suas características quânticas e capacidade de reação com moléculas orgânicas, aceleram o envelhecimento. Atribui-se a eles a origem do envelhecimento, mas independentemente de ser realmente esta a origem, é sabido que estas espécies reativas estão muito ligadas ao envelhecimento e às suas alterações (SCOTTI & VELASCO, 2003).

A exposição crônica à radiação UV é a principal causa de câncer de pele (ICHIHASHI *et al.*, 2003). Os raios UV podem danificar diretamente o DNA celular, levando à mutações nos genes e conseqüentemente ao câncer de pele (BRIDGES, 1998; BERG, 2004).

Conforme já citado anteriormente os raios UVC não chegam à superfície terrestre por serem absorvidos na camada de ozônio, porém em virtude da destruição desta camada a incidência destes raios (mais carcinogênicos que os UVB), juntamente com os UVB, têm aumentado progressivamente sobre a terra, sendo, portanto, cada vez mais necessária a utilização de produtos que forneçam proteção a estes efeitos nocivos da radiação UV (CHISVERT *et al.*, 2001).

Segundo LAMBERT (1982) o homem dispõe de alguns sistemas de proteção natural contra a radiação solar: a camada córnea, a secreção sudorípara e a melanina. O primeiro está relacionado ao espessamento da epiderme após exposição à radiação solar com o intuito de absorver a maior parte dos raios UV, impedindo que eles alcancem camadas mais profundas da pele e, com isso, causem efeitos indesejáveis. Já o sistema relacionado à secreção sudorípara está ligado ao ácido urocânico (presente no suor) que

possui alta absortividade na região UVB e tem sua concentração aumentada após exposição à radiação solar (ZENIZEK, 1968). Outro sistema de proteção natural da pele está relacionado à melanina que, após exposição solar, tem sua formação estimulada com o objetivo de absorver a radiação UV antes que ela atinja o DNA do núcleo das células (SABATOWICH, 2004). Além disso, segundo MEYBECK (1978), a função de proteção da melanina não se deve apenas à absorção da radiação UV, mas também pela sua estrutura polimérica capaz de captar radicais livres gerados pela ação da radiação UV.

Os conhecimentos relacionados a estes possíveis efeitos indesejáveis dos raios solares levaram ao desenvolvimento de formulações cosméticas para a prevenção destes efeitos sobre a pele.

Mas isso não é recente. O óleo de oliva era utilizado como um tipo de protetor solar pelos gregos antigos, todavia não era muito efetivo. Em 1928, nos Estados Unidos foi documentado o primeiro uso de protetor solar: uma emulsão contendo salicilato e cinamato de benzila. O primeiro protetor solar produzido em escala comercial surgiu em 1936. Já na segunda guerra mundial, o farmacêutico Benjamin Greene criou um protetor solar que funcionava principalmente pelo bloqueio físico dos raios solares, na tentativa de proteger os soldados dos efeitos indesejáveis da radiação UV.

Um filtro solar bastante utilizado nesta época foi o Ácido p-aminobenzóico (PABA), e muitos foram os casos de reações alérgicas desencadeadas pelo seu uso. Além disso, em 1977 foi criado o primeiro protetor solar a prova d’água, e, na década de 80, foi lançado industrialmente o primeiro protetor solar UVA/UVB (SUSANA, 2008).

Os filtros solares podem ser classificados como inorgânicos, ou também chamados de físicos, quando têm capacidade de dispersar e absorver a radiação UV.

Atualmente nos Estados Unidos da América existem dois filtros solares com estas características aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA): óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO_2). Contudo os filtros solares também podem ser orgânicos, ou também chamados de químicos, quando absorvem a radiação UV e depois dissipam com energia de comprimento de onda maior (SCHERSCHUN, 2001). A Figura 3 representa uma ilustração da diferença entre estes dois tipos de filtros solares:

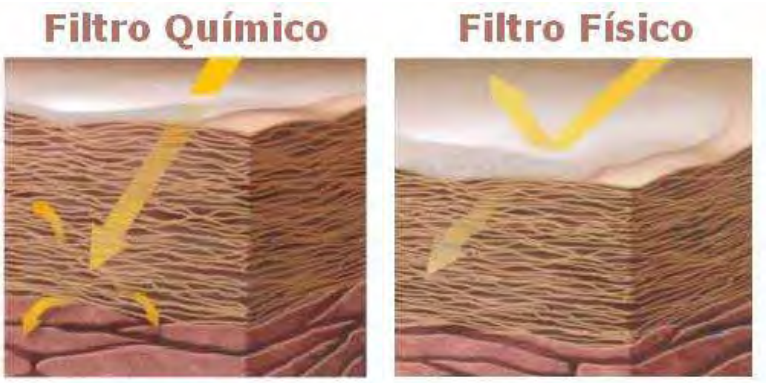


Figura 3. Proteção química e física contra a radiação solar (Fonte: TOVO, 2004).

Em virtude da fotoinstabilidade dos filtros solares químicos, o estudo de estabilidade se faz necessário. Este estudo permite predizer quais as condições em que o produto em questão se mantém mais estável, ou degrada-se mais facilmente, de acordo com o tempo e com as condições em que foram submetidos, podendo acelerar ou retardar alterações no produto que variam com o tempo. Possibilita a inferência do prazo de validade ou fornece informações para esta determinação, além de características a respeito da segurança e confiabilidade do produto testado (BRASIL, 2004; BABY *et al*., 2004).

No fim da década de 70 o FDA (Food and Drug Administration) definiu os filtros solares como seguros e eficazes na prevenção do câncer de pele, envelhecimento precoce e queimaduras solares e introduziram o fator de proteção solar (FPS). O FPS

mede a eficácia de uma formulação de protetor solar, indicando quantas vezes o tempo de exposição ao sol, usando-se o filtro solar, pode ser aumentado, sem risco de eritema (PAOLA, 2001).

A eficácia de um fotoprotetor é bastante influenciada pela formulação cosmética visto que os componentes presentes na fórmula podem acarretar aumento ou diminuição do FPS. Além disso, a espessura da camada do fotoprotetor aplicada sobre a pele e a uniformidade do filme formado também podem influenciar no FPS. Uma desvantagem do FPS é que ele está relacionado apenas à formação de eritema e por isso mede, somente, proteção frente à radiação UVB (PAOLA, 2001; CORREA, DAVOLOS e DAVOLOS, 2007). A equação 1 apresenta o cálculo de FPS.

$$\textbf{FPS} = \frac{\textbf{\textit{DEM} (pele protegida)}}{\textbf{\textit{DEM} (pele não protegida)}}$$

Equação 1. Cálculo de FPS **(**DEM representa a dose eritematosa mínima).

O Brasil não desenvolveu metodologia própria para avaliação do FPS e, desta forma, adota oficialmente as metodologias aplicadas ou seguidas pelos seguintes órgãos: FDA (*Food and Drud Administration*) e COLIPA (*The European Cosmetic Toiletry and Perfumary Association*) (FREITAS *et al*., 2001).

A Europa segue os mesmos critérios estabelecidos para produtos cosméticos, não havendo recomendação específica. Nos EUA o produto é regularizado como OTC (Over the Counter), diferindo apenas na rotulagem uma vez que prioriza a declaração do ingrediente ativo. A metodologia COLIPA é um pouco mais detalhada, diferindo em alguns aspectos em relação ao FDA, dentre eles detalhes experimentais como área de aplicação do produto, progressão das séries de doses UV, a formulação utilizada como

controle, forma de cálculo do FPS final, número de voluntários, validação do teste e critérios para determinação de resistência à água (SAYRE, *et al.*, 2003).

De acordo com a Portaria nº 2466 de 31 de agosto de 2010, a análise de FPS deve ser feita *in vivo*, porém os ensaios *in vitro* constituem ferramentas importantes e normalmente utilizadas para os estudos preliminares da determinação do FPS de novos filtros solares e no controle de qualidade destas formulações, em virtude dos altos custos envolvidos nos ensaios com voluntários (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

Para a realização dos testes de FPS *in vivo* a quantidade necessária de protetor solar, que deverá ser aplicado sobre a pele dos voluntários, é de 2mg/cm². Logo o consumidor deste produto deve aplicar a mesma quantidade sobre a pele a fim de manter o FPS referido. Porém estudos demonstram que os consumidores aplicam quantidades de protetor solar muito menores do que o esperado, e como conseqüência, têm o FPS alterado. De acordo com DIFFEY (2001) o FPS alcançado é, normalmente, 20 a 50% menor que o esperado. Além disso, a reaplicação do produto e a resistência do mesmo à água também são de extrema importância visto que podem alterar sua função fotoprotetora.

Dentre as classes de filtros solares químicos ou orgânicos pode ser citada a família dos cinamatos, na qual o p-metoxicinamato de octila (OMC) é um dos mais utilizados na proteção frente à radiação UVB do espectro eletromagnético (SHAATH e PATHAK, 1997). A Figura 4 mostra a estrutura molecular dos cinamatos onde pode-se observar uma insaturação extra, conjugada com o anel aromático e o grupamento carbonila que permite o deslocamento eletrônico.

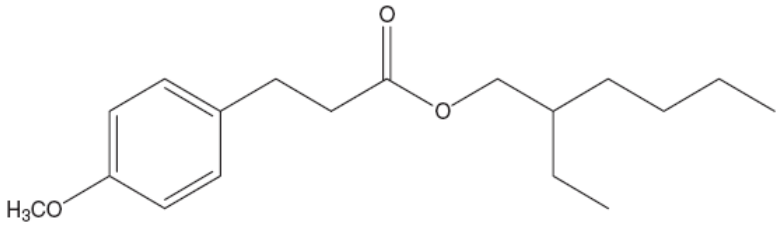


Figura 4. Esquema da estrutura molecular do OMC.

O OMC é o mais comum e provavelmente o cinamato mais utilizado globalmente como filtro UVB. Está presente em vários produtos cosméticos, e em virtude de sua característica de lipossolubilidade é incluído principalmente nos produtos que necessitam de resistência à água (RIETSCHEL & FLOWLER, 2001). É freqüentemente usado em combinação com outros absorvedores UVB para alcançar FPS com altos valores no produto final. Sua aplicação tópica é bem tolerada: a irritação da pele é quase insignificante e a dermatite de fotocontato é rara. Após a exposição à luz solar pode ocorrer degradação e formação de um fotoproduto com menor capacidade de absorção UV (ANTONIOU, 2008). De acordo com HUONG (2007), o OMC, após ser irradiado, pode sofrer degradação por dimerização da estrutura molecular e, como conseqüência, perder sua ação. Porém quando associado a outros filtros solares, o OMC tem sua degradação diminuída.

Diferentemente do OMC, que é um filtro solar líquido lipossolúvel, a Benzofenona-3 é um filtro solar lipossolúvel comercializado na forma de pó, e necessita, portanto, ser adequadamente solubilizado na fase graxa das emulsões. Para isto a inclusão de alguns ésteres líquidos (adipato de dibutila, triglicerídeo de ácido cáprico caprílico, estearato de octila) torna-se necessária para garantir sua solubilização,

evitando, assim, recristalização e conseqüente perda ou diminuição da sua ação. Além disso, alguns filtros solares líquidos, como o OMC e o salicilato de octila, são considerados bons solventes para a benzofenona-3.

Embora tipicamente as benzofenonas sejam absorvedores UVB, a Benzofenona-3 também absorve radiação UVA II (UVA curto), podendo ser considerado um filtro de largo espectro. É utilizada como co-absorvedor, em associação a filtros específicos de UVB (SCHAUDER & IPPEN, 1997). A estrutura química da benzofenona-3 está representada na Figura 5.

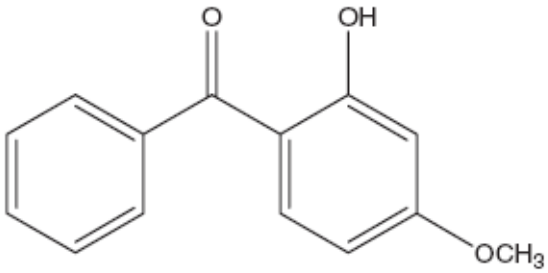


Figura 5. Estrutura química da Benzofenona-3.

O Ácido Sulfônico Fenilbenzimidazol é um filtro solar UV-B, que representa um dos poucos filtros hidrossolúveis existente no mercado. É comercializado na forma de pó e sua solubilização em água requer neutralização com um álcali (STEVENSON & DAVIES, 1999). A Figura 6 representa a estrutura química do ácido sulfônico fenilbenzimidazol.

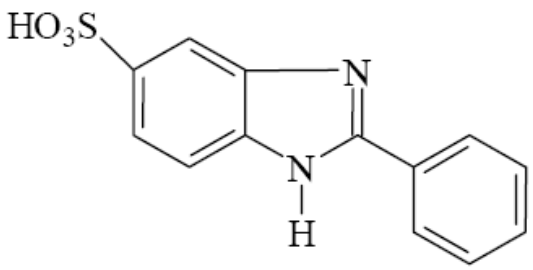


Figura 6. Estrutura molecular do ácido sulfônico fenilbenzimidazol.

O filtro solar mais recentemente introduzido no mercado é o Bemotrizinol-BEMT (Tinosorb® S) que apresenta amplo espectro de absorção da radiação UV, sendo capaz, portanto, de absorver UVA I e II (curto e longo) e UVB. Ele se enquadra na tendência de mercado que exige cada vez mais a redução da quantidade de filtros químicos presentes nos fotoprotetores, uma vez que com a utilização de apenas um filtro solar já se consegue um amplo espectro de absorção. Trata-se de um produto altamente eficiente, fotoestável e lipossolúvel. Além disso, pode aumentar a fotoestabilidade do OMC (MONGIAT *et al.*, 2003; ANTONIOU, 2008). A estrutura química do BEMT está representada na Figura 7**.**

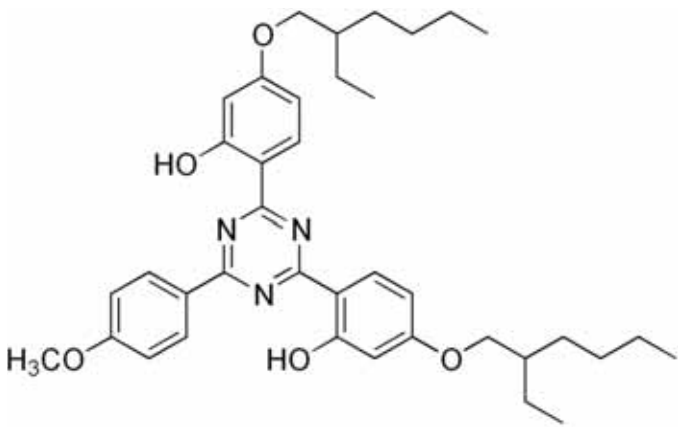


Figura 7. Estrutura química do BEMT (Tinosorb® S).

A associação de filtros solares pode conferir proteção de amplo espectro à pele e a fotoestabilidade deles pode conferir proteção de longa duração (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; OZER *et al*., 2001; MAIER *et al*, 2001).

A epiderme desempenha importante função de proteção à pele (FORSLIND *et al*., 1997). É a camada mais superficial da pele, sendo constituída por várias camadas ou estratos: estrato córneo, granuloso, espinhoso e basal. É nesta camada da pele, mais especificamente entre as células basais, que se encontram os melanócitos, responsáveis por produzir e distribuir os grânulos de melanina, que, desempenha importante papel na proteção contra os raios UV. A derme tem maior contribuição na resistência mecânica e é responsável pela elasticidade e flexibilidade da pele uma vez que é constituída de fibras de elastina e colágeno (SHAELFER & REDELMEIER, 1996; McCRACKEN & WALKER, 2001). Na Figura 8 estão representadas as camadas da pele.

A camada córnea é a camada mais superficial da epiderme e funciona como barreira à perda de água do organismo para o meio ambiente e contra a penetração de produtos do meio ambiente (LÉPORI, 2002).

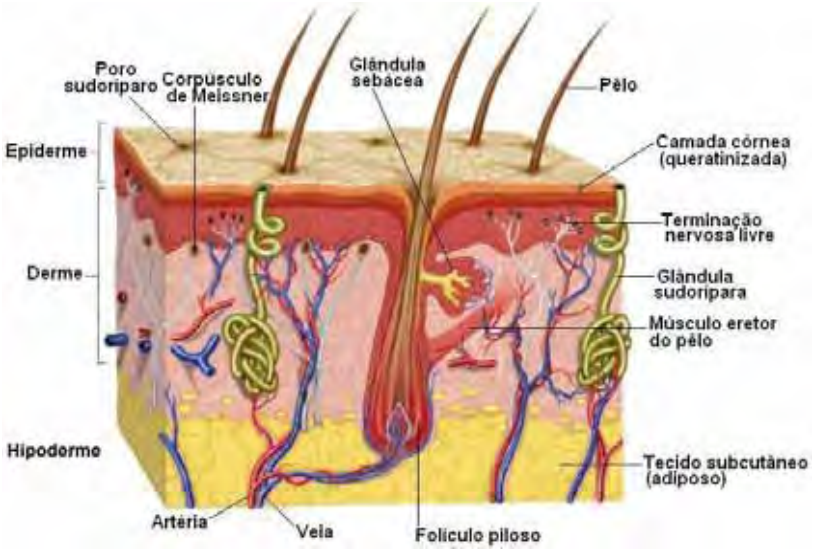


Figura 8. Representação esquemática das camadas da pele (L'ORÉAL, 2010).

De acordo com FITZPATRICK (1976), os tipos de pele podem ser classificados em categorias, conforme pode ser visto na Tabela 1, levando-se em consideração as características físicas e respostas da pele à radiação UV.

Tabela 1. Classificação dos fototipos de pele de acordo com FITZPATRICK (1976).

Grupo		Eritema	Pigmentação	Sensibilidade
I	Branca	Sempre se queima	Nunca se bronzeia	Muito sensível
II	Branca	Sempre se queima	Às vezes se bronzeia	Sensível
III	Morena clara	Queima (moderado)	Bronzeia (moderado)	Normal
IV	Morena moderada	Queima (pouco)	Sempre se bronzeia	Normal
V	Morena escura	Queima (raramente)	Sempre se bronzeia	Pouco sensível
VI	Negra	Nunca se queima	Totalmente pigmentada	Insensível

Hoje, de uma maneira geral, um protetor solar ideal deve conter em sua formulação, filtros solares com ampla capacidade de absorção da radiação UVB e UVA, preferencialmente fotoestáveis a fim de evitar que a pele entre em contato com os possíveis sub-produtos resultantes da degradação dos mesmos. A fotoinstabilidade pode constituir-se num problema bastante sério, uma vez que, além de comprometer a fotoproteção, pode originar sub-produtos que sejam tóxicos para a pele. Para tanto é comum o uso de associações nas formulações com o objetivo de cumprir os requisitos acima citados, garantindo maior segurança ao consumidor. Outra característica bastante importante é que o protetor solar não deve ser irritante, sensibilizante e fototóxico, e não permear a pele evitando, assim, absorção sistêmica. Além disso, é interessante que o

filtro solar seja atóxico, resistente à água e adequado para preparações cosméticas (NOHYNEK, & SCHAEFER, 2001; SASSON, 2006).

De acordo com JI ANG *et al.* (1998) e JACOBI *et al.*(2004), é necessário que a quantidade de filtro solar penetrada na pele permaneça nas camadas mais superficiais da pele, garantindo assim máxima proteção e mínima permeação cutânea. Vale ressaltar que a função de fotoproteção é perdida quando o filtro solar permeia a pele e atinge a circulação sistêmica, uma vez que fica impossibilitado de exercer sua ação (MILESI & GUTERRES, 2002).

Deve ser levado em consideração que as formulações fotoprotetoras são aplicadas em grandes áreas do corpo e por este motivo é importante quantificar a possível penetração cutânea e distribuição sistêmica de filtros solares uma vez que pode auxiliar na avaliação do potencial toxicológico local e sistêmico, facilitando, com isso, o desenvolvimento de novas formulações eficientes e seguras (GUPTA *et al.,* 1999; SARVEIJA *et al.,* 2004).

A taxa de permeação depende das propriedades dos componentes da formulação, da integridade da pele e das características físico-químicas do veículo. (DE PAOLA, 2001). A penetração através do estrato córneo depende do peso molecular, lipofilicidade, polaridade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, solubilidade e valor de pKa das substâncias analisadas (SCHAEFER & RIEDELMAYER, 1996).

A análise de penetração na pele pode ser feita através da utilização de técnica *in vitr*o, em que são utilizadas células de difusão, consistindo em um líquido receptor e uma fase doadora separadas por membrana sintética ou pele (SARVEIJA *et al*., 2004). As características *in vivo*, nem sempre serão satisfatoriamente reproduzidas, todavia sabendo-se que o passo limitante para a permeação cutânea *in vivo* é a difusão através do estrato córneo, uma metodologia *in vitro* bem fundamentada poderá produzir

resultados bastante coerentes com os *in vivo* (BARRY, 1983). Além disso, os estudos *in vitro* são uma ferramenta muito valiosa e determinante na avaliação do comportamento de formulações semi-sólidas de uso tópico, diante das inúmeras variáveis que comprometem o processo de fabricação. Através deles se obtém dados que possibilitam um maior entendimento dos fatos ocorridos, desde a aplicação na pele, liberação do princípio ativo da forma farmacêutica, retenção e absorção cutânea. (NOKHODCHI *et al*., 2003).

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* publicados têm demonstrado que certos agentes de proteção solar são absorvidos através da pele humana após aplicação tópica (HAGEDORN-LEWEKE & LIPPOLD, 1995; TREFFEL & GABARD, 1996; HAYDEN et al., 1997; JIANG et al., 1999; POTARD et al., 2000).

WATKINSON *et al.* (1992) sugeriram que quantidades consideráveis de filtros solares têm o poder de penetração na pele dependendo das características físico-químicas e da composição química do seu veículo.

JANJUA *et al*. (2008) detectaram o OMC no plasma (7ng/mL-mulheres e 16ng/mL- homens) e urina (6ng/mL- mulheres e 4ng/mL- homens) de seres humanos.

Esses efeitos indesejáveis resultantes da absorção de filtros solares podem ser maiores em crianças que em adultos em virtude da maior proporção de área superficial com relação ao peso corpóreo, o que acarreta maior captação e bioacumulação (JANJUA, 2008).

Efeitos estrogênicos de alguns filtros solares têm sido constatados em animais de laboratório, com manifestações de tumores (TOUITOU & GODIN, 2008).

Outros estudos indicaram que alguns filtros solares, inclusive o OMC, podem ter efeitos endócrinos indesejáveis, como por exemplo, no eixo “hipotálamo-pituitário-gonadal” (KLAMMER *et al*., 2007).

De acordo com SCHLUMPF et al. (2004), tanto os órgão reprodutores quanto o sistema nervoso central são alvos sensíveis ao desenvolvimento de efeitos endócrinos por substâncias químicas como os filtros solares. Em seu trabalho pôde observar que seis dos nove filtros testados, entre eles o OMC, levaram a um aumento do peso uterino de ratos imaturos e oito desses mesmos nove filtros, entre eles o OMC, tiveram atividade estrogênica. Neste estudo os animais também foram tratados, por gavagem, com filtros solares dissolvidos em óleo de oliva (0,04mL/10g de peso corpóreo).

Com base na referência bibliográfica apresentada observa-se a necessidade de avaliar a segurança dos produtos destinados à fotoproteção, para que seus riscos potenciais, relacionados à fotodegradação e absorção sistêmica dos filtros solares, possam ser conhecidos e estudados. E, dessa forma, evitar a formação de compostos de toxicidade desconhecida e o aparecimento de efeitos indesejáveis.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a interferência dos filtros solares benzofenona-3, ácido sulfônico fenilbenzimidazol e Bemotrizinol (BEMT) na estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do p-metoxicinamato de octila (OMC).

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo das formulações de filtros solares: uma contendo apenas o OMC e a outra a associação dos filtros solares OMC, benzofenona-3, ácido sulfônico fenilbenzimidazol e BEMT;
- Caracterização das formulações;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por HPLC para a determinação e quantificação do OMC nas formulações;
- Determinação da estabilidade das formulações e do filtro solar OMC;
- Realização de ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea do OMC *in vitro* para cada formulação;
- Comparação dos resultados obtidos entre as formulações.

5. JUSTIFICATIVA

A exposição aos raios solares pode ocasionar danos à saúde, e uma forma de proteção é a utilização de fotoprotetores. No entanto, o uso seguro destes produtos requer o conhecimento de seus riscos potenciais tais como degradação- que pode originar compostos de elevada toxicidade- e absorção sistêmica. Assim no presente trabalho foram analisadas duas formulações fotoprotetoras com o intuito de verificar a estabilidade e a possibilidade de permeação cutânea do filtro solar OMC.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATÉRIAS-PRIMAS, MATERIAIS, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

- Poliglicerina, álcool berrênico e estearil lactato de sódio- Nikkomulese®(Cosmotec);
- Triglicerídeo de ácido cáprico caprílico (Croda do Brasil);
- Adipato de dibutila (All Chemistry);
- Estearato de octila (Pharma Special);
- p-Metoxicinamato de octila- OMC (Pharma Nostra);
- Propilenoglicol (Synth);
- Carbômero dispersão a 2%- Carbopol®940 (Pharma Chemical);
- EDTA (Volp);
- Metilparabeno (Henry Pharma);
- Propilparabeno (Deg);
- Trietanolamina;
- Ácido sulfônico fenilbenzimidazol (Mapric);
- Benzofenona-3 (Chemyunion);
- BEMT (Bemotrizinol)- Tinosorb® S (BASF);
- Corante hidrofílico (Amarelo de tartrazina 10%);
- Corante lipofílico (F. Braum);
- Lâminas e lamínulas de vidro;
- Sensor cone-placa (C35/2° Ti);
- Coluna Symmetry C-18, 5µm (4,6 x 150mm);
- Fitas adesivas 3M Scotch;
- Membrana sintética de acetato de celulose;

- Pele de orelha de porco;
- Bisturi e lâmina tamanho 21;
- Tesoura cirúrgica;
- Água Millipore-modelo Synergy;
- Ácido perclórico- Merck;
- Acetonitrila grau HPLC- J.T.Baker (USA);
- Isopropanol grau HPLC- J.T.Baker (USA);
- Tampão fosfato pH 7,4;
- Polissorbato 80- Tween® 80;
- Geladeira Eletrolux Prosdócimo, doublé D44;
- Estufa de secagem e esterilização Famem, 315 SE;
- Centrífuga Fanem-Baby 208;
- Balança Shimadzu AW 220;
- Espectrofotômetro UV/Visível modelo HP 8453;
- Célula de difusão vertical de Franz Modificada – Hanson Corporation;
- Microscópio de luz polarizada Carl Zeiss – Axioskop – 40;
- Reômetro Haake RS-1;
- HPLC Waters 600 Controller;
- Detector UV Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector;
- Balança Shimadzu AW220;
- Peagômetro Quimis G400AS;
- Ultrassom 2840D Odontobrás;

6.2 PROCEDIMENTOS

6.2.1Preparo das formulações

As formulações foram preparadas de acordo com a técnica usual de preparo de emulsões em que a fase aquosa é aquecida e vertida sobre a fase oleosa, também aquecida à mesma temperatura. Os filtros lipossolúveis, como O OMC, a Benzofenona-3 e BEMT foram incorporados na fase oleosa das emulsões antes do aquecimento e contato com a fase aquosa. O Ácido Sulfônico Fenilbenzimidazol foi primeiramente dispersado em água, na seqüência foi adicionada trietanolamina para alcalinização e conseqüente solubilização do filtro hidrossolúvel e por fim esta solução foi incorporada na emulsão já pronta e resfriada.

Foram preparadas três emulsões, a primeira sem a presença de filtros solares (F-B), a segunda contendo apenas OMC (F-1) e a terceira contendo OMC e outros três filtros solares como Benzofenona-3, Ácido Sulfônico Fenilbenzimidazol e BEMT (F-2). As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam a composição percentual das formulações.

Tabela 2. Composição percentual da F-B.

INCI NAME	MATÉRIA-PRIMA	%
Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	Nikkomulese®	4
Caprilic/Capric Triglyceride	Triglicerídeo de ácido cáprico caprílico	2
Dibutyl Adipate	Adipato de dibutila	4
Ethylhexyl Stearate	Estearato de octila	1
Propilene Glycol	Propilenoglicol	4
Carbomer	Carbômero dispersão a 2%	50
EDTA	EDTA	0,05
Methylparaben	Metilparabeno	0,18
Propylparaben	Propilparabeno	0,02
Triethanolamine	Trietanolamina	qs pH 6,0
Aqua	Água	qsp 100

Tabela 3. Composição percentual da F-1.

INCI NAME	MATÉRIA-PRIMA	%
Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	Nikkomulese®	4
Caprilic/Capric Triglyceride	Triglicerídeo de ácido cáprico caprílico	2
Dibutyl Adipate	Adipato de dibutila	4
Ethylhexyl Stearate	Estearato de octila	1
Ethylhexyl Methoxycinnamate	**p-Metoxicinamato de octila**	**5**
Propilene Glycol	Propilenoglicol	4
Carbomer	Carbômero dispersão a 2%	50
EDTA	EDTA	0,05
Methylparaben	Metilparabeno	0,18
Propylparaben	Propilparabeno	0,02
Triethanolamine	Trietanolamina	qs pH 6,0
Aqua	Água	qsp 100

Tabela 4. Composição percentual da F-2.

INCI NAME	MATÉRIA-PRIMA	%
Behenyl Alcohol, Polyglyceryl-10 Pentastearate, Sodium Stearoyl Lactylate	Nikkomulese®	4
Caprilic/Capric Triglyceride	Triglicerídeo de ácido cáprico caprílico	2
Dibutyl Adipate	Adipato de dibutila	4
Ethylhexyl Stearate	Estearato de octila	1
Benzophenone-3	**Benzofenona-3**	**2**
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine-BEMT	**Tinosorb S**	**2**
Ethylhexyl Methoxycinnamate	**p-Metoxicinamato de octila**	**5**
Propilene Glycol	Propilenoglicol	4
Carbomer	Carbômero dispersão a 2%	50
EDTA	EDTA	0,05
Methylparaben	Metilparabeno	0,18
Propylparaben	Propilparabeno	0,02
Triethanolamine	Trietanolamina	qs pH 6,0
Aqua	Água	qsp 100
Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid	**Ácido sulfônico fenilbenzimidazol**	**2**
Triethanolamine	Trietanolamina	qs solubilização
Aqua	Água	10

6.2.2Caracterização das formulações

6.2.2.1 Determinação do tipo de emulsão

Amostras de 0,5g das formulações foram colocadas em lâminas de vidro, utilizando-se uma lâmina para cada formulação (F-B, F-1 e F-2). Em cada uma das lâminas foram colocadas duas amostras iguais de cada formulação, uma para receber o corante hidrofílico e outra o lipofílico. Foi colocada 1 gota de cada corante e as amostras resultantes analisadas quanto a homogeneização por microscopia (PRISTA *et al*., 1996).

6.2.2.2 Avaliação da formação de cristal líquido por microscopia de luz polarizada

Levando-se em consideração essa informação seguiu-se com o teste de avaliação da formação de cristal líquido que se deu da seguinte forma: as lâminas e lamínulas de vidro foram mergulhadas em solução sulfocrômica e deixadas em contato por alguns minutos, seguindo-se de enxágüe e secagem. Uma alíquota de cada formulação foi colocada sobre a lâmina e coberta com a lamínula. As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio de luz polarizada, a fim de se observar a possível formação de cristais líquidos.

6.2.2.3 Estudo do comportamento reológico das formulações

O comportamento reológico das formulações foi analisado através dos seguintes ensaios: curva de fluxo, com tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa/s para a curva ascendente por um período de 120 segundos e de 100 a 0 Pa/s para a curva descendente também por 120 segundos; Curva de tensão com limite de escoamento, com tensão de cisalhamento de 0 a 10 Pa, por 300 segundos; Varredura de tensão, com tensão de cisalhamento de 0 a 150 Pa e freqüência de 1Hz; Varredura de freqüência, com freqüências variáveis de 0,1 a 20 Hz e tensão de 1 Pa; Fluência e relaxação, com tensão

de cisalhamento de 1 Pa durante 150 segundos para fluência e 150 segundos para relaxação.

Todos os ensaios foram realizados à temperatura de 32°C e analisados através do Software Rheowin 3. No estudo de curva de fluxo os valores de tixotropia foram analisados através do método dos mínimos quadrados e no teste de fluência e relaxação foi utilizado o modelo reológico J Relaxation 3, ambos realizados pelo próprio software.

6.2.3 Determinação do OMC por HPLC

6.2.3.1Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram escolhidas levando-se em consideração o estudo de ORSI *et al., (*2006) e ajustadas às nossas condições laboratoriais e finalidade analítica. O sistema cromatográfico foi assim definido:

- gradiente de fase móvel (água pH 3,0 e acetonitrila, 90:10 invertendo-se a proporção em 30 minutos, seguindo-se de retorno à proporção inicial em 1 minuto);

- fluxo de 1,6 mL/min;

- temperatura da coluna: 35ºC;

- volume de injeção: 50µL;

- detector UV operando em 300nm.

Utilizando-se solução de ácido perclórico 1M, conseguiu-se atingir pH=3 na água utilizada como fase móvel, visto que o filtro solar ácido sulfônico fenilbenzimidazol, por causa de seu grupo funcional ácido, tem bastante tendência a sofrer ionização e precisa, portanto, se manter na forma molecular para garantir sua análise.

6.2.4 Validação do método analítico

O método foi validado de acordo com a RDC 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em "Guia para validação de métodos analíticos", categoria I "Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias–primas" (BRASIL, 2003).

Os parâmetros avaliados para a determinação dos limites de confiança do método foram:

6.2.4.1 Especificidade e Seletividade

Para esta análise, feita em triplicatas, foram utilizadas soluções, em isopropanol, de OMC, emulsão base (sem filtros solares), e emulsão base com OMC. Estas soluções foram injetadas no HPLC a fim de verificar a especificidade e seletividade do método analítico ao filtro solar OMC. O critério de aceitação foi o coeficiente de variação menor que 15% e valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

6.2.4.2 Linearidade

A curva analítica foi construída com 8 níveis de concentrações (0,75, 1,5, 3,125, 6,25, 10, 25, 50 e 100µg/mL) de OMC.

As soluções contendo OMC foram preparadas em isopropanol, nas concentrações desejadas e injetadas no HPLC em triplicatas. As áreas, obtidas para cada concentração, foram utilizadas para a construção da curva, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação. Critério mínimo de aceitação $R^2 > 0,99$.

6.2.4.3 Precisão e exatidão

Foram utilizadas três concentrações da curva analítica (100, 10 e 0,75µg/mL), em triplicatas, para a análise da proximidade entre os resultados obtidos (precisão) e

proximidade dos valores obtidos com os valores teóricos (exatidão). Os testes foram avaliados intradia e interdia. O critério de aceitação foi o coeficiente de variação menor que 15%, para precisão, e valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste, para exatidão.

6.2.4.4 Robustez

Para o estudo de robustez do método foram feitas pequenas variações dos parâmetros analíticos, como pH (2,8 e 3,2) da fase móvel, troca de coluna (C18 Symmetry 5µm- 4,6x150mm e Symmetry 3,5µm- 4,6x75mm), temperatura (34°C e 36°C) e fluxo (1,5 e 1,7mL/min) da fase móvel. A variação da composição da fase móvel, conforme descrito na RDC 899/2003, foi inviável uma vez que a mesma se apresenta na forma de gradiente, não tendo, portanto, como alterar sua composição.

Critério de aceitação: valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste e coeficiente de variação menor que 15%.

6.2.5 Validação do método para estudo de permeação e retenção cutânea

A validação do método utilizado para o estudo de permeação e retenção cutânea foi realizada levando-se em consideração os ítens a seguir:

- Seletividade
- Recuperação
- Linearidade em meio receptor
- Precisão e exatidão
- Limite de detecção
- Limite de quantificação

O solvente extrator e meio receptor, utilizados para o estudo de retenção e permeação cutânea, respectivamente, foram injetados, em triplicatas, no sistema cromatográfico a fim de verificar a seletividade do método ao filtro solar OMC. O critério de aceitação foi o coeficiente de variação menor que 15% e valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

O estudo de recuperação foi feito, em triplicatas, utilizando-se solução de OMC em isopropanol, de concentração conhecida (50µg/mL), e os procedimentos foram os mesmos utilizados nos estudos de retenção cutânea, que serão detalhados mais adiante. As soluções obtidas após o teste de retenção foram analisadas por HPLC a fim de verificar a porcentagem de recuperação do OMC neste estudo. O critério de aceitação foi valor de recuperação próximo de 100%, com coeficiente de variação menor que 15% e valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

A linearidade em meio receptor foi necessária para a quantificação dos valores obtidos no estudo de permeação cutânea. Foram utilizadas 6 concentrações de OMC (0,5, 0,75, 1,5, 3,125, 6,25 e 12,5µg/mL) para a construção da curva analítica, em triplicatas e, com isso, a equação da reta e o coeficiente de correlação puderam ser obtidos. Critério mínimo de aceitação $R^2 > 0,99$.

Os testes de precisão e exatidão foram feitos em triplicatas utilizando-se três concentrações da curva analítica em solução receptora (12,5µg/mL, 6,25µg/mL e 0,5µg/mL) intradia e interdia. O critério de aceitação foi o coeficiente de variação menor que 15%, para precisão, e valores de 80% a 120% da concentração teórica do teste, para exatidão.

O limite de detecção foi obtido analisando-se soluções de concentrações conhecidas e decrescentes de OMC, até a obtenção do valor que obedeceu a relação de três vezes o ruído da linha de base.

O limite de quantificação foi obtido da mesma forma que o de detecção, porém obedecendo-se a relação sinal-ruído superior a 10:1, com coeficiente de variação < 15%.

6.2.6 Estudo de estabilidade das formulações

Todas as análises de estabilidade seguiram o Guia de estabilidade de produtos cosméticos (Brasil, 2004).

6.2.6.1 Teste de centrifugação

Inicialmente foi feito o teste de centrifugação para verificar possível separação de fases nas formulações F-B, F-1 e F-2 estudadas. O teste foi realizado com três ciclos de centrifugação à 3000rpm, durante 30 minutos, para cada formulação. Logo após, na ausência de separação de fases, seguiu-se com os testes de estabilidade.

6.2.6.2 Estabilidade preliminar das formulações

Cada uma das formulações (F-B, F-1 e F-2) foi submetida a seis diferentes condições, entre elas cinco condições de estresse à formulação. As formulações foram deixadas à temperatura ambiente, à –5 ºC (freezer), 5 ºC (geladeira), 45 ºC (estufa), expostas à luz indireta, e a ciclos de congelamento e descongelamento. A condição de luz indireta foi obtida colocando-se as formulações em frascos transparentes e armazenando-os em frente à janela do almoxarifado do laboratório de cosmetologia, onde recebiam luz solar indireta durante o período da manhã. Cada formulação foi monitorada durante 15 dias, para a verificação da sua estabilidade preliminar.

Durante este estudo foram avaliados os seguintes itens: características organolépticas (aspecto, cor e odor), pH e viscosidade. O aspecto e a cor foram analisados visualmente, o odor através do sensorial, o pH com auxílio do peagômetro e

a viscosidade através do reômetro. As análises das características organolépticas e de pH foram realizados em todos os dias da estabilidade preliminar, enquanto que a viscosidade foi analisada nos 1º, 7º e 14º dias. As medidas de pH e viscosidade foram feitas em triplicatas.

6.2.6.2 Estabilidade acelerada das formulações

Durante o estudo de estabilidade acelerada as formulações (F-B, F-1 e F-2) foram submetidas às seguintes condições: temperatura ambiente, –5 ºC (freezer), 5 ºC (geladeira), 45 ºC (estufa) e luz indireta. O tempo de monitoramento foi de 90 dias.

Os itens avaliados e os equipamentos utilizados foram os mesmos utilizados na estabilidade preliminar das formulações. As análises das características organolépticas e de pH foram realizadas nos 1º, 7º, 15º, 21º, 35º, 45º, 60º e 90º dias e a da viscosidade foi realizada nos 1º, 7º, 14º, 21º, 45º, 60º e 90 dias. As medidas de pH e viscosidade, assim como na estabilidade preliminar, foram feitas em triplicatas.

6.2.6.3 Itens avaliados nos estudos de estabilidade preliminar e acelerada das formulações

As formulações foram retiradas das condições de estresse e armazenadas à temperatura ambiente por 4 horas antes do início das análises, a fim de evitar interferência da temperatura nos resultados de estabilidade das formulações. Logo após o término das análises as formulações foram, então, novamente armazenadas em suas respectivas condições de estresse.

Avaliação das características organolépticas

As formulações foram analisadas quanto aos aspecto, odor e cor durante o estudo de estabilidade afim de verificar possíveis alterações organolépticas.

Determinação do pH das formulações

O pH das formulações foi verificado através de dispersão aquosa a 10% (p/p) de cada formulação. A cada alíquota de emulsão pesada foi adicionada água destilada seguindo-se de homogeneização e medição do pH. O eletrodo do peagômetro utilizado foi introduzido diretamente na dispersão após calibração do aparelho (DAVIS *et al.*, 1977).

Análise de viscosidade

A viscosidade foi analisada pelo teste de curva de fluxo, com tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa para a curva ascendente por um período de 120 segundos e de 100 a 0 Pa para a curva descendente também por 120 segundos. Além disso, os resultados analisados foram os de viscosidade aparente mínima, ou seja, quando a emulsão foi submetida ao maior cisalhamento.

6.2.7 Estudo de estabilidade do OMC

Da mesma forma que no estudo de estabilidade das formulações, as mesmas eram retiradas de suas condições de estresse e armazenadas à temperatura ambiente antes do início das análises, e, no final, recolocadas em suas respectivas condições.

Foram utilizadas apenas as condições de temperatura ambiente, luz indireta e temperatura de 45 ºC (estufa) em virtude do alto tempo de retenção do OMC, o que

impossibilitou a análise em todas as condições utilizadas nos estudos de estabilidade anteriores.

6.2.7.1 Estabilidade química preliminar do OMC

As formulações F-1 e F-2 foram monitoradas durante 15 dias, a fim de verificar o teor de OMC na estabilidade química preliminar, dentro de cada condição em que foram expostas.

Uma alíquota da emulsão foi pesada e solubilizada em isopropanol. Logo após fez-se a injeção no HPLC com o objetivo de identificar e quantificar o OMC. A análise foi feita no 1º dia (24h após a manipulação das formulações para que o produto pudesse adquirir consistência final), e nos 7º e 14º dias, em triplicata.

6.2.7.2 Estabilidade química acelerada do OMC

Os testes foram feitos da mesma forma que os da estabilidade química preliminar, porém por um período de 90 dias. As análises foram feitas nos 1º, 7º, 14º, 30º, 60º e 90º dias.

6.2.7.3 Análise do FPS (Fator de Proteção Solar) e manutenção do mesmo durante o estudo de estabilidade acelerada

As formulações também foram armazenadas nas condições de temperatura ambiente, luz indireta e temperatura de 45 ºC (estufa) e analisadas por um período de 90 dias.

Técnica de Mansur

Foram preparadas soluções das formulações F-1 e F-2, em isopropanol, para avaliação do FPS por espectrofotometria no ultravioleta. A técnica estipula que as concentrações finais das soluções sejam de 0,2mg/mL (MANSUR *et al.*, 1986). Depois

de atingida esta concentração as análises em espectrofotômetro foram realizadas na faixa de comprimento de onda entre 290 a 320nm (ultravioleta B) em intervalos de 5nm. As amostras das duas formulações foram analisadas em triplicatas.

Para o cálculo do FPS, foram utilizados os valores obtidos na Tabela 5, que relaciona o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) em cada comprimento de onda, e os valores de absorbâncias obtidos, utilizando-se a equação de Mansur (Equação 1):

$$\mathbf{FPS}_{\mathbf{espectrofotométrico}} = \mathbf{FC.} \sum_{290}^{320} \mathbf{EE}\,(\lambda)\mathbf{.\ I}\,(\lambda)\mathbf{.\ abs}\,(\lambda) \quad \text{(Equação 1)}$$

onde: FC =10 (fator de correção); EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ); I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ); Abs (λ) = valor espectrofotométrico da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ) (MANSUR *et al.*, 1986).

Tabela 5. Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (Mansur *et al.*, 1986).

λ (nm)	EE (λ) X I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Σ=	1,0000

6.2.8 Determinação da solução receptora utilizada nos estudos de liberação e permeação cutânea

Optou-se pela utilização de tampão fosfato pH 7,4 (OECD, 2004). Porém o OMC, por ter características lipossolúveis, tornou necessária a adição de tensoativo, e o escolhido foi o Polissorbato 80 (Tween® 80).

Foram preparadas soluções receptoras contendo concentrações diferentes de Tween® 80: 0,2%, 1% e 2 %. Uma quantidade em excesso de OMC foi adicionada à 5mL de cada solução a ser testada, seguindo-se de agitação magnética por 24 horas e centrifugação por 15 minutos à 5000rpm e o sobrenadante foi diluído no mesmo meio a ser testado e analisado por HPLC.

6.2.9 Estabilidade do OMC na solução receptora escolhida

Foi adicionada uma solução de OMC, de concentração conhecida (50µg/mL), à 7 mL da solução receptora escolhida e agitada por 1 minuto. Logo após procedeu-se à avaliação por HPLC. As próximas análises se deram nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 12h, assim como nos ensaios de liberação e permeação, a fim de verificar a estabilidade do OMC, com o passar do tempo, uma vez que nestes estudos o filtro solar analisado fica em contato com a solução receptora por 12h, antes de ser analisado por HPLC.

6.2.10 Estudo de liberação do OMC nas formulações

As membranas foram primeiramente hidratadas e logo após utilizadas para o estudo de liberação, sendo colocadas na célula de difusão de Franz (volume de 7,0mL) em contato com o meio receptor. Foi colocada 250mg da formulação a ser avaliada até completar o anel dosador do equipamento (com área de 1,77cm^2), sobre a membrana sintética, removendo assim o excesso de formulação e evitando a formação de bolhas entre a formulação e a membrana sintética. Os experimentos foram conduzidos a 37ºC e

a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm por meio de um agitador magnético e foram analisados um n=6.

Após tempos pré-determinados de 2, 4, 6, 8 e 12 horas, exato 1mL da solução receptora foi coletado para possível identificação e quantificação do filtro solar OMC liberado, por HPLC, e novo 1mL de solução receptora foi reposto ao meio consecutivamente. Os cálculos para quantificação real do OMC liberado levaram em consideração as diluições ocorridas durante o processo, e para isso foi utilizada a equação 2:

$$\mathbf{Q_{real,\,t} = C_t \cdot V_r + \Sigma\ V_c \cdot C_c} \quad \text{(Equação 2)}$$

onde: Q real, t é igual a quantidade real permeada referente ao tempo t , Ct é igual a concentração obtida referente ao tempo t, Vr é o volume da solução receptora (7 mL), Cc a concentração da amostragem anterior e Vc o volume amostrado.

Logo após o término do estudo, construiu-se uma curva analítica com os resultados obtidos, respeitando-se as exigências dos modelos cinéticos de liberação analisados, a fim de verificar qual a cinética de liberação das formulações levando-se em consideração o maior R^2. Os modelos analisados foram zero ordem e primeira ordem.

6.2.11 Estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* do OMC

6.2.11.1 Utilização de pele de orelha de porco

Peles de orelha de porco, dermatomizadas, foram as membranas escolhidas para a realizaçao dos experimentos de permeação *in vitro.* A origem das orelhas de porco foi o abatedouro Olhos D´Água (cidade de Ipuâ-SP). Assim que chegaram ao laboratório estas orelhas passaram por um processo de remoção da cartilagem e tecido adiposo (dissecação), com auxílio do bisturi, e limpeza com água purificada. Após limpeza as

peles foram dermatomizadas à 500µm e congeladas a -5ºC. As orelhas congeladas foram guardadas por no máximo 30 dias e a cada dia de experimento foram descongeladas em quantidade necessária para a realização do teste. As Figuras 9 e 10 apresentam as orelhas antes e após dissecação e dermatomização.

(a) **(b)** **(c)**

Figura 9. Orelhas de porco prontas para dissecação (a) e (b) e após dissecação (c).

Figura 10. Orelhas de porco já dermatomizadas e prontas para o estudo *in vitro* de permeação e retenção cutânea.

6.2.11.2 Estudo de permeação cutânea *in vitro*

A pele dermatomizada, e pronta para ser utilizada, foi colocada na célula de difusão (volume de 7,0mL), com o lado da derme voltado para baixo, em contato com o meio receptor. Na região do estrato córneo foi colocada a formulação a ser avaliada (250mg) até completar o anel dosador do equipamento (área de 1,77cm^2) removendo assim o excesso de formulação e evitando a formação de bolhas entre a formulação e a pele. Os experimentos foram conduzidos a 37ºC e a solução receptora constantemente agitada a 300 rpm por meio de um agitador magnético. Após tempos pré-determinados de 2, 4, 6, 8 e 12 horas, exato 1mL da solução receptora foi coletado para possível

identificação e quantificação do filtro solar OMC permeado, por HPLC, e novo 1mL de solução receptora foi reposto ao meio consecutivamente.

Assim como no estudo de liberação, o cálculo da real concentração de OMC permeado foi feito utilizando-se a equação 2 que leva em consideração as diluições ocorridas durante o processo.

A Figura 11 mostra um esquema da célula de difusão utilizada nos estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*:

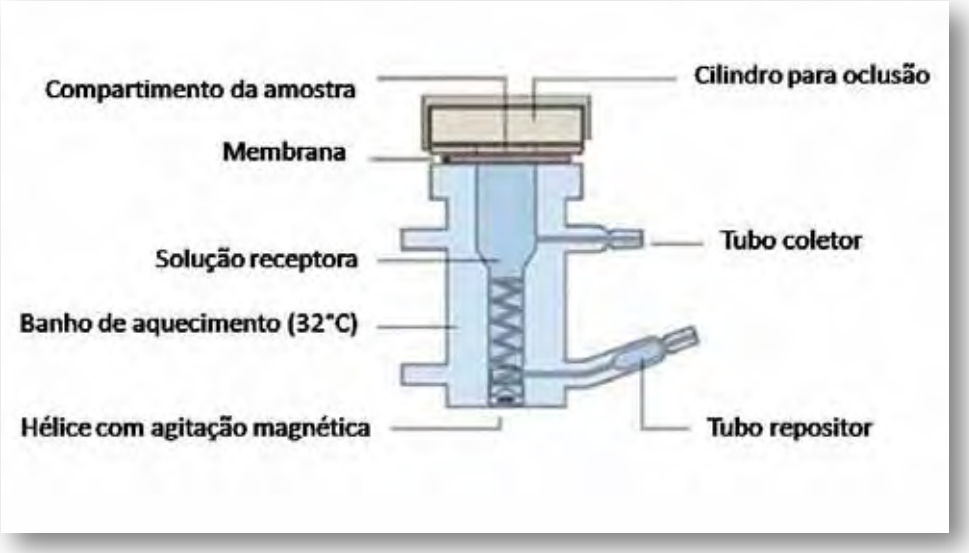


Figura 11. Esquema da célula de difusão utilizada nos estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro*.

6.2.11.3 Estudo de retenção cutânea *in vitro*

Após o término do estudo de permeação, ou seja, após 12 horas, as peles foram retiradas da célula de difusão e o excesso de formulação presente foi delicadamente removido com água destilada. As peles foram posteriormente secas com papel absorvente, fixadas em superfície plana e a área de exposição à formulação delimitada para a remoção do estrato córneo. O estrato córneo foi removido com auxílio de 12 fitas

adesivas. As fitas adesivas foram transferidas para tubos cônicos contendo 3mL de isopropanol, os quais foram agitados em mixer por 1 minuto e em seguida sonicados por 15 minutos em banho de ultra-som. Após este procedimento o sobrenadante foi separado para identificação e quantificação do filtro solar OMC retido na camada do estrato córneo, por HPLC.

A pele fixa na superfície plana, já sem o estrato córneo, foi então removida e a área de contato com a formulação recortada com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, picotada e transferida para tubo cônico contendo 3mL de isopropanol. Em seguida foi sonicado durante 30 segundos. A solução foi deixada por 30 minutos em banho de ultra-som para rompimento das células.

A solução final foi analisada para identificação e quantificação do filtro solar OMC retido nas camadas de epiderme + derme, por HPLC.

6.3 Análise estatística

Para o estudo de estabilidade a análise estatística foi feita utilizando-se o teste ANOVA. Já para os estudos de liberação, permeação e retenção cutânea utilizou-se o Teste Mann Whitney. Os estudos de precisão, exatidão e robustez foram analisados levando-se em consideração o coeficiente de variação.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Preparo das formulações

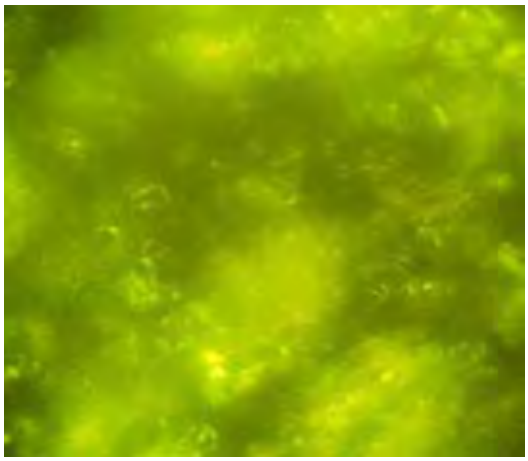
As formulações F-B e F-1 obtiveram coloração branca, enquanto que a F-2 amarelo claro. A presença de triglicerídeo de ácido cáprico caprílico, adipato de dibutila e estearato de octila teve o intuito de fornecer à formulação toque não oleoso e proporcionar sensação de sedosidade à pele.

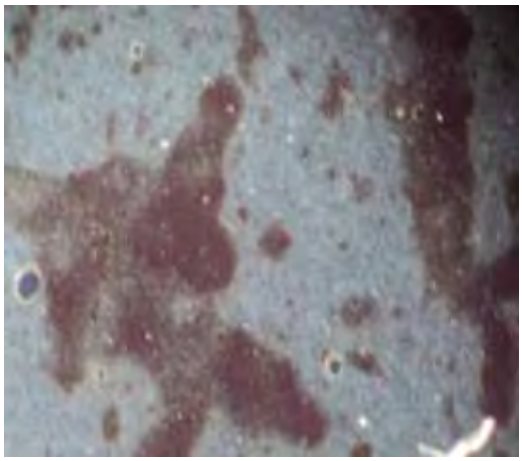
7.2 Caracterização das formulações

7.2.1 Determinação do tipo de emulsão

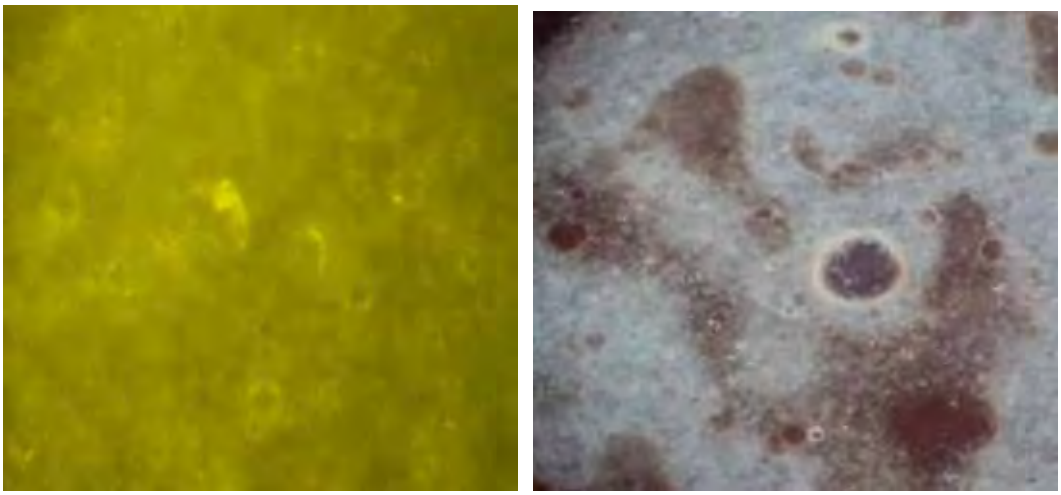
Através da análise dos resultados obtidos neste ensaio observou-se que as três formulações estudadas são do tipo O/A. Isto se dá em virtude da fase externa das emulsões ter se corado homogeneamente com o corante hidrofílico (de coloração amarela), o que comprova que a fase externa da emulsão é aquosa.

As Figuras 12, 14 e 16 apresentam fotos de microscopia das três formulações estudadas e mostram que todas as formulações tiveram homogeneidade com a utilização do corante amarelo (corante hidrofílico) na fase externa, o que não ocorre com as Figuras 13, 15 e 17 que apresentam gotículas marrons, mostrando que o corante lipofílico não conseguiu se solubilizar na fase externa das emulsões.

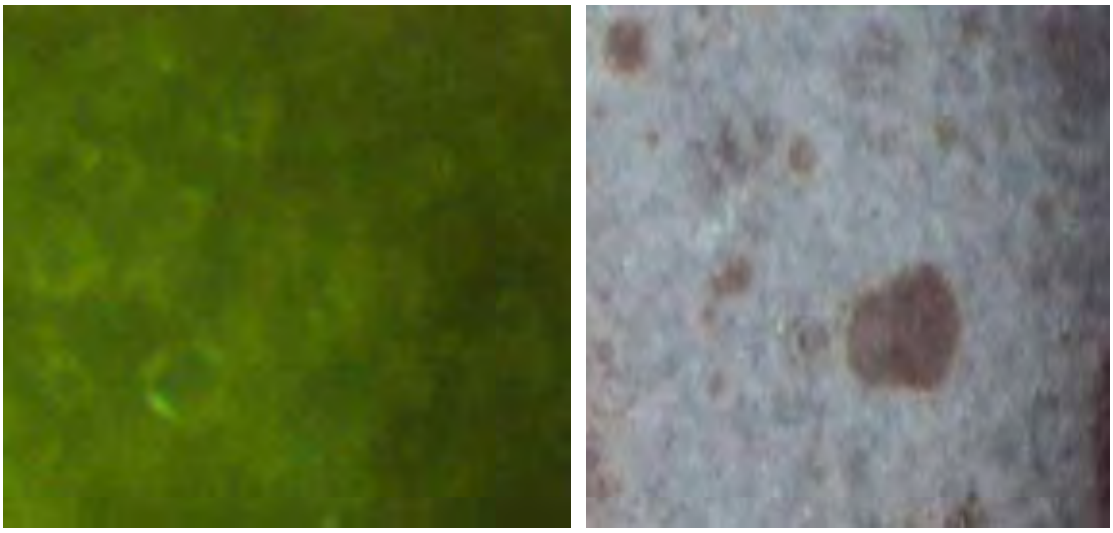




Figuras 12 e 13. Fotos de microscopia da formulação F-B em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente.



Figuras 14 e 15. Fotos de microscopia da formulação F-1 em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente.



Figuras 16 e 17. Fotos de microscopia da formulação F-2 em contato com os corantes hidrofílicos e lipofílicos respectivamente.

A análise deste tipo de característica da emulsão é bastante importante uma vez que a determinação do tipo de emulsão utilizada pode ter influência sobre os resultados do estudo de permeação e retenção cutânea das formulações, que também fazem parte dos objetivos deste trabalho. O veículo utilizado no preparo da formulação pode alterar as propriedades do estrato córneo e assim influenciar a penetração de ativos presentes na mesma (DUPUIS *et al.*, 1986; MONTENEGRO *et al.*, 2008).

A obtenção de uma emulsão O/A é interessante por oferecer sensorial agradável ao consumidor (FLOR *et al.*, 2007).

7.2.2 Avaliação da formação de cristal líquido

A técnica de microscopia de luz polarizada se caracteriza como sendo uma das técnicas utilizadas para se evidenciar estruturas líquido-cristalinas (NORLING *et al.*, 1992; BRINON *et al.*, 1999). Porém outros testes, como por exemplo, espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), devem ser realizados com o intuito de garantir a existência deste tipo de estrutura, uma vez que apenas a microscopia de luz polarizada não é suficiente.

Os resultados obtidos, após a realização deste teste, evidenciaram a presença de estruturas líquido-cristalinas em todas as formulações, como pode ser visto nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 18. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-B.

Figura 19. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-1.

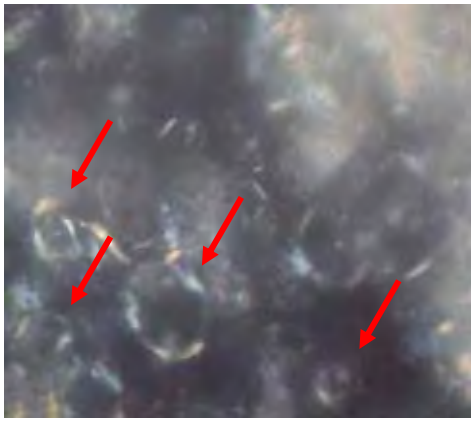


Figura 20. Foto de estruturas semelhantes às líquido-cristalinas presentes na F-2.

Em emulsões cosméticas, o tipo de cristal líquido mais comumente encontrado é o liotrópico, este tipo apresenta um arranjo estrutural que tem sido atribuído à fase lamelar, responsável pela estabilização da emulsão devido ao aumento da viscosidade (Klein, 2002).

Com respeito à emulsão O/A, sabe-se que a adição de álcoois graxos aumenta à viscosidade do sistema e, conseqüentemente, melhora a estabilidade da emulsão. De acordo com SANTOS, 2006, emulsões com cristais líquidos possuem aplicações que atendem a atual expectativa de formulações para uso tópico, dentre elas a alta estabilidade.

Algumas matérias primas, presentes no mercado, são capazes de produzir cristais líquidos e dentre elas pode-se destacar o Nikkomulese 41®, utilizado no preparo das formulações F-B, F-1 e F-2 do presente trabalho. Esta matéria prima é constituída por uma mistura de tensoativos e álcool graxo que garante estabilidade às formulações pela capacidade de formar uma estrutura reticular de gel, acompanhada por cristais líquidos lamelares.

Além disso, estas estruturas têm capacidade de influenciar a difusão de substâncias para a pele uma vez que podem interagir com o estrato córneo, facilitando este processo (BRINON *et al.*, 1999). Com isso pode-se observar que a presença de cristais líquidos pode influenciar no processo de permeação cutânea de filtros solares, e por este motivo os resultados obtidos por este teste são de extrema importância para o estudo de permeação que também é objeto de estudo do presente trabalho.

7.2.3 Estudo do comportamento reológico das formulações

A análise das propriedades reológicas é de extrema importância na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico e auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo, tornando possível a detecção de sinais de instabilidade física, facilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulação teste e produtos finais (BARRY, 1993; ALMEIDA & BAHIA, 2003; CORREA *et al.*, 2005).

7.2.3.1 Curva de fluxo

Os resultados obtidos durante o estudo de curva de fluxo estão representados na Figura 21.

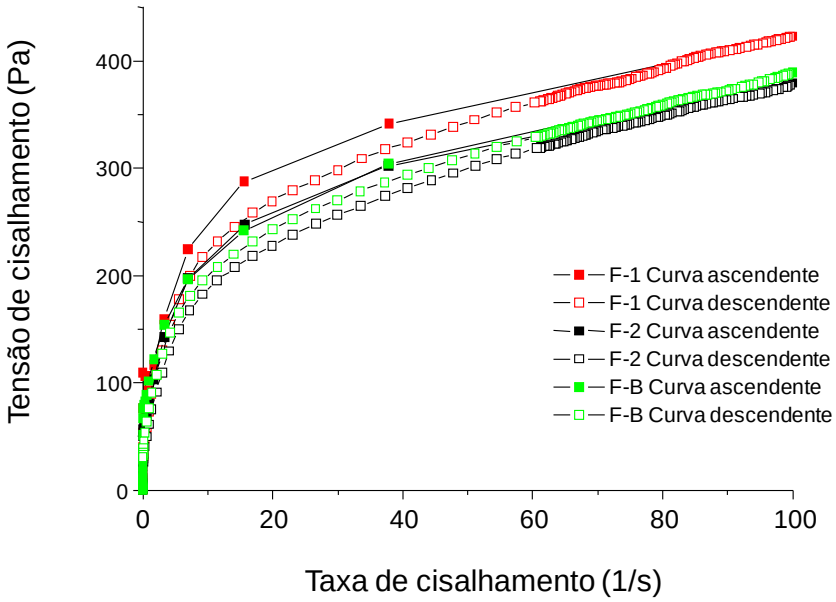


Figura 21. Curva de fluxo das formulações F-B, F-1 e F-2.

Através da Figura 21 observou-se que as formulações possuem comportamento de fluxo não newtoniano, uma vez que não apresentaram viscosidade constante durante o estudo de curva de fluxo. Com o aumento da taxa de cisalhamento houve diminuição da viscosidade, o que caracteriza fluidos pseudoplásticos (SCHRAMM, 2006). O fato de uma formulação de filtro solar apresentar este comportamento pseudoplástico é interessante para sua aplicação no mercado cosmético, uma vez que a diminuição da viscosidade, durante a aplicação do produto na pele, melhora as características de espalhabilidade desta formulação.

Além disso, outra característica apresentada na Figura 21 foi a tixotropia, que pode ser visualizada uma vez que as curvas ascendentes e descendentes não foram sobrepostas, formando uma área de histerese entre elas. No momento em que a velocidade de cisalhamento é removida o sistema tende a readquirir a estrutura inicial e a taxa de recuperação parcial nos primeiros segundos ou minutos é muito importante.

Uma vez aplicado na pele o produto deve recuperar sua estrutura inicial a fim de evitar que o mesmo escorra, sendo, portanto, de extrema importância a presença deste comportamento tixotrópico (MARTIN *et al*., 1969; SCOTT, 2000; SCHRAMM, 2006). Dessa forma, em se tratando de formulações fotoprotetoras, a presença de tixotropia é necessária a fim de evitar que o produto escorra após ser aplicado na pele, além de garantir a formação de um filme homogêneo sobre a pele e a manutenção das características fotoprotetoras (MARTIN, 1993).

A Tabela 6 apresenta os valores de tixotropia e viscosidade aparente mínima, obtidos no estudo de curva de fluxo, em relação às três formulações estudadas:

Tabela 6. Valores de tixotropia e viscosidade aparente mínima (Pa.s) das formulações F-B, F-1 e F-2 (Médias de três leituras e desvio menor que 5%).

CURVA DE FLUXO	F-B	F-1	F-2
Tixotropia	944,27*	1492,67	1483
Viscosidade aparente	3,85	4,25*	3,84

*apresentam diferença estatística

Através da análise de variância (ANOVA) observou-se diferença entre os valores de tixotropia das F-1 e F-2 em relação à F-B, isto é, a F-B apresentou valores menores de tixotropia. Assim, concluiu-se que a presença de filtros solares, neste caso, proporcionou um aumento de tixotropia nas formulações.

Outro resultado obtido foi em relação aos valores de viscosidade aparente mínima onde, também com a aplicação do teste ANOVA, verificou-se que F-1 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à F-B e F-2, apresentando maior valor. Com isso observou-se que a presença do filtro solar OMC aumentou a viscosidade da emulsão, porém a associação de filtros causou diminuição da mesma. Essa diminuição de viscosidade pode ser explicada pela adição do filtro solar

hidrossolúvel, ácido sulfônico fenilbenzimidazol, à emulsão (SOUZA, 2005). Isto porque ele pode interagir com o Carbopol® e diminuir a viscosidade da formulação.

Este estudo de viscosidade das formulações é bastante interessante uma vez que esta característica, da mesma forma que a presença de cristais líquidos, pode afetar a permeação cutânea de filtros solares, que também é objeto de estudo do presente trabalho (POTTER *et al.*, 1999; TSAI *et al.*, 1999). CROSS *et al.* (2001) sugeriram que formulações viscosas impediram a penetração cutânea de diferentes concentrações de benzofenona-3. Os mesmos autores apresentaram também outra importância relacionada à viscosidade relatando que uma forma de controlar a formação de um filme uniforme e efetivo de filtros solares na pele é fazendo uso de formulações dotadas de alta viscosidade.

7.2.3.2 Curva de tensão com limite de escoamento

Este ensaio permite a observação da tensão necessária para que a formulações comecem a fluir. Os resultados estão representados na Figura 22:

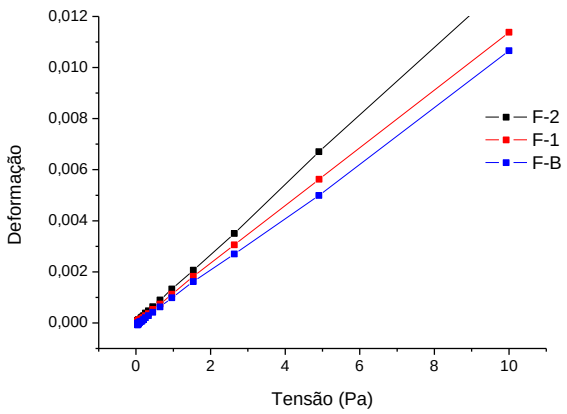


Figura 22. Curva de tensão com limite de escoamento para as formulações F-B, F-1 e F-2.

Os valores médios de tensão encontrados para que as formulações F-B, F-1 e F-2 começassem a escoar foram respectivamente: 0,3237, 0,0589 e 0,0532 Pa. Através da utilização do ANOVA verificou-se que F-B apresentou diferença em relação às F-1 e F-2, ou seja, necessitou de maior tensão para começar a escoar. Portanto, a presença de filtros solares melhorou, neste caso, as características de escoamento das formulações, o que também pode influenciar na espalhabilidade do produto na pele.

7.2.3.3 Varredura de tensão

Através desse teste pode-se observar qual a faixa de tensão de cisalhamento em que se observa um comportamento viscoelástico linear das formulações, ou seja, valores de tensão de cisalhamento em que as formulações não sofrem desorganização de sua estrutura, e podem, portanto, serem avaliadas corretamente. Isso pode ser visto nas Figuras 23, 24 e 25. Caso, os ensaios posteriores fossem realizados fora desta faixa linear, os resultados obtidos poderiam ser incorretos, avaliados em tensões insuficientes para causar a fluência do produto em análise, ou excessiva, causando a desestruturação do produto. É, portanto, um teste preliminar para os testes de viscoelasticidade.

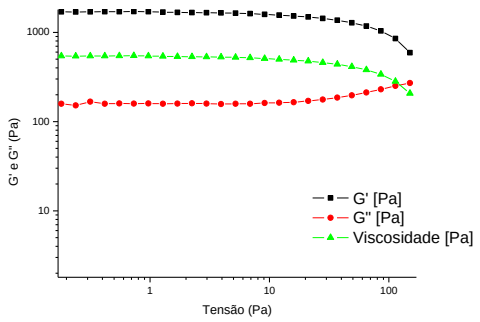


Figura 23. Varredura de tensão da formulação F-B.

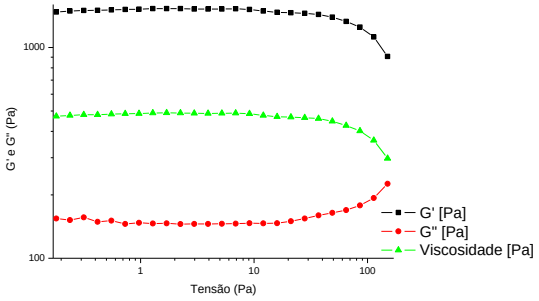


Figura 24. Varredura de tensão da formulação F-1.

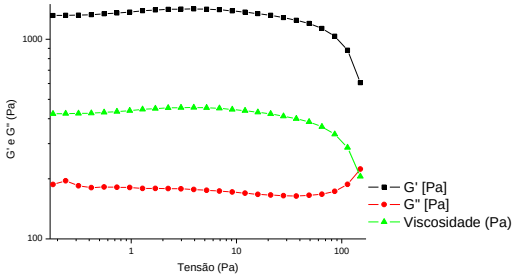


Figura 25. Varredura de tensão da formulação F-2.

Em todos os resultados de varredura de tensão obtidos pode ser visto que no valor de 1 Pa as formulações não sofrem desorganização de sua estrutura. Por este motivo este valor foi escolhido para a análise dos testes posteriores.

7.2.3.4 Varredura de freqüência

Este estudo determina os valores de G' e G'': módulo de estocagem ou elástico, que representa a energia armazenada durante a deformação e liberada quando a tensão é relaxada, e módulo de perda ou viscoso, que não pode armazenar energia visto que a tensão aplicada é dissipada na forma de deformação irreversível (TOKUMOTO, 1996). As Figuras 26, 27 e 28 mostram os resultados obtidos.

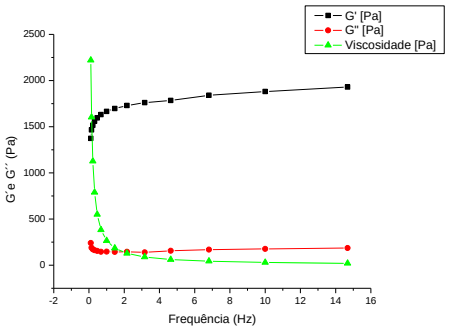


Figura 26. Varredura de freqüência da formulação F-B.

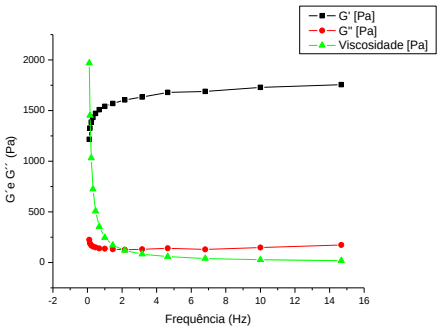


Figura 27. Varredura de freqüência da formulação F-1.

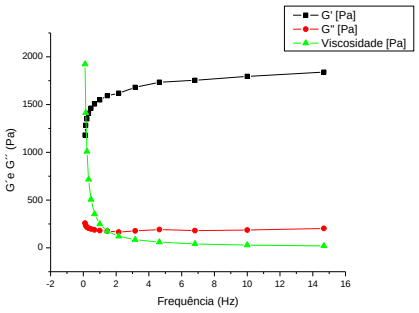


Figura 28. Varredura de freqüência da formulação F-2.

Em todos os gráficos observou-se que G' é maior que G", mostrando que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, como ocorre em geral em sistemas emulsionados O/A (CEFALI, 2009). Isso também mostra maior estabilidade das formulações.

Outra informação importante é que a viscosidade das formulações diminuiu, comprovando o que já tinha sido concluído com os ensaios de curva de fluxo realizados anteriormente.

7.2.3.5 Fluência e relaxação

O teste de fluência e relaxação permite diferenciar respostas elásticas e viscosas, sendo, portanto, um teste de viscoelasticidade (SCHRAMM, 2006). Os resultados estão apresentados na Figura 29.

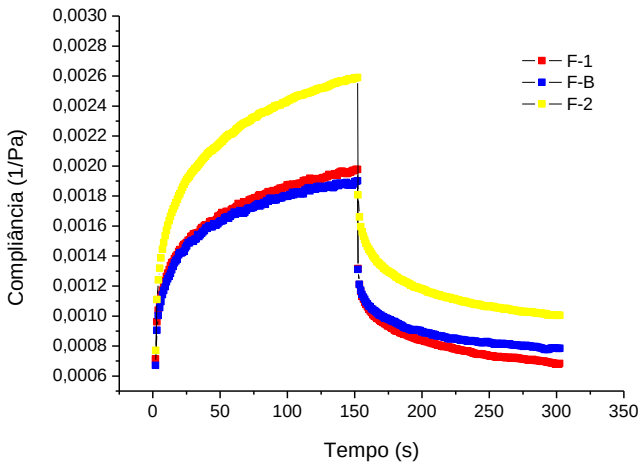


Figura 29. Fluência e relaxação das formulações F-B, F-1 e F-2.

De acordo com o software Software Rheowin 3, os resultados de fluência e relaxação, para as três formulações, seguiram o modelo reológico J Relaxation 3, em

que elas apresentam três unidades viscoelásticas e que, portanto, demoram mais para recuperar a estrutura inicial após cessar o cisalhamento. Esta é uma característica interessante já que a formulação de filtro solar, muitas vezes, é utilizada em grande região do corpo e, por isso, necessita de maior tempo para que sua estrutura seja recuperada.

Os três gráficos, quando sobrepostos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

7.3 Determinação do OMC por HPLC

7.3.1 Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico estabelecido permitiu a identificação do OMC, assim como a sua quantificação. A Figura 30 representa um cromatograma do OMC:

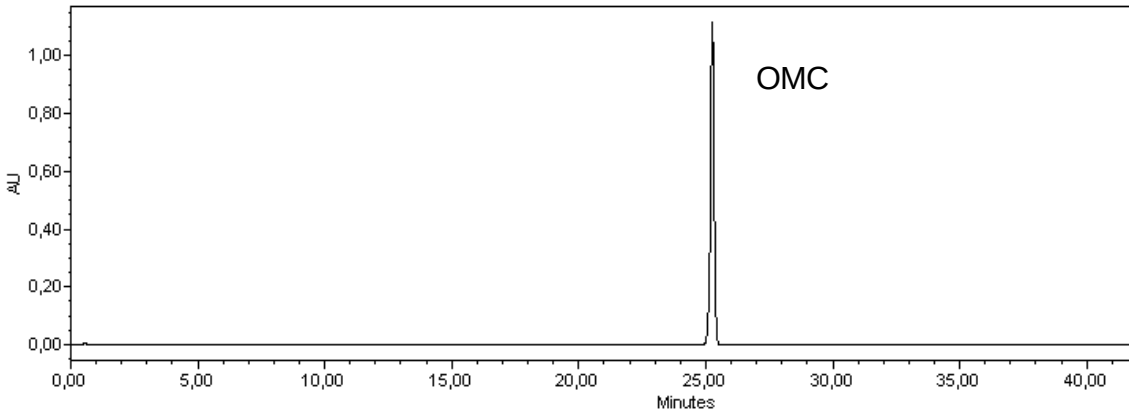


Figura 30. Cromatograma do OMC.

Na Figura 30 pode ser observado que o tempo de retenção do OMC se dá entre 25 e 26 minutos, e este tempo não pôde ser diminuído uma vez que era necessário separar o pico do OMC dos outros filtros solares estudados, evitando interferências nas identificações de seus picos nos cromatogramas .

Já a Figura 31 mostra um cromatograma dos filtros ácido sulfônico fenilbenzimidazol, benzofenona-3 e OMC.

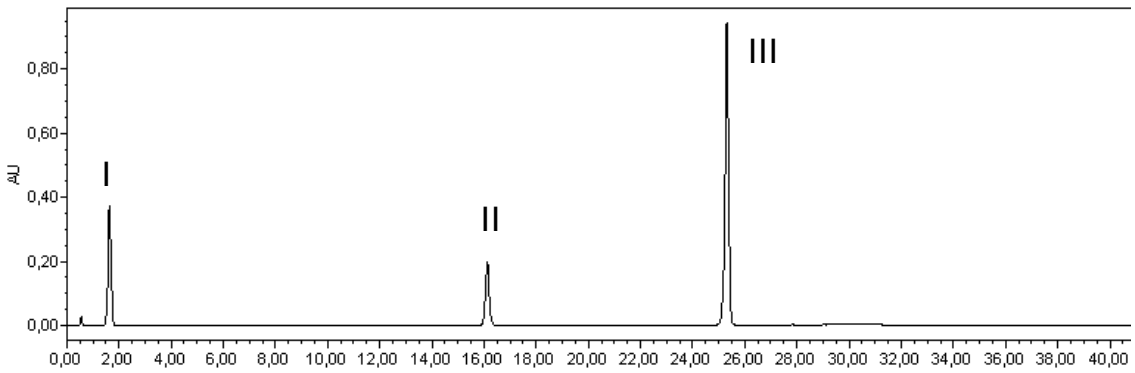


Figura 31. Cromatograma dos filtros ácido sulfônico fenilbenzimidazol (I), Benzofenona-3 (II) e OMC (III).

Nestas condições cromatográficas, por um tempo de 50 minutos, o BEMT não foi identificado, como pose ser observado na Figura 32:

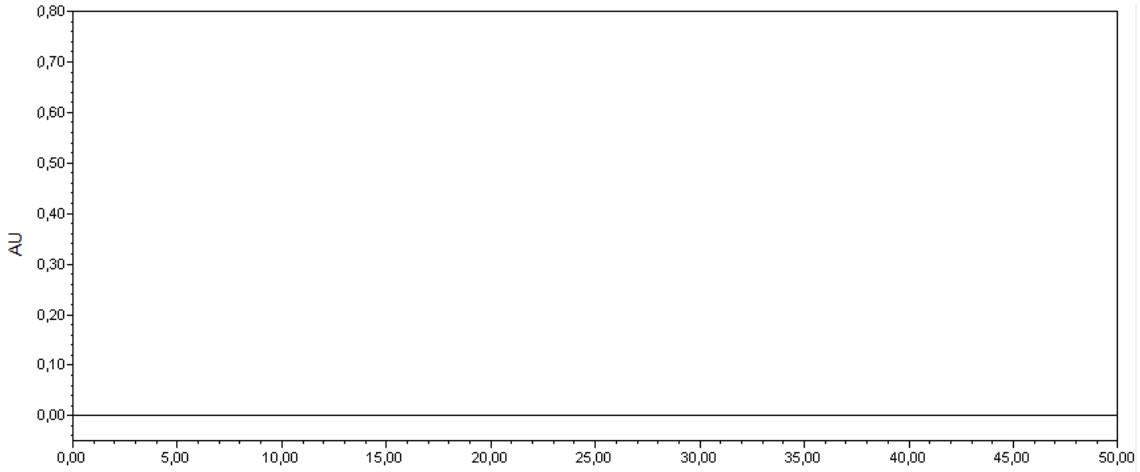


Figura 32. BEMT não identificado nestas condições cromatográficas durante 50 minutos.

Observou-se, portanto que para que o BEMT fosse identificado deveriam ser utilizadas outras condições cromatográficas, o que não ofereceu problemas uma vez que o filtro solar de interesse na sua identificação e quantificação foi o OMC.

NYEBORG *et al.* (2010) conseguiram a identificação do BEMT com outra condição cromatográfica: fase móvel etanol e água ácida, com 40°C de temperatura da coluna, fluxo de 1,2mL/min e detector UV operando em 312nm. O resultado apresentado por estes autores explica a não identificação do BEMT no presente trabalho

uma vez que seriam necessárias, para tanto, outras condições cromatográficas que não as utilizadas.

7.4 Validação da metodologia de identificação e quantificação do OMC

7.4.1 Especificidade e seletividade

Através da análise de especificidade e seletividade pode ser concluído que o solvente extrator (isopropanol) e a emulsão base não interferem na identificação e quantificação do OMC uma vez que o pico cromatográfico analisado é atribuído apenas ao OMC.

7.4.2 Construção da curva analítica

Os resultados obtidos para a construção da curva analítica estão representados na Figura 33.

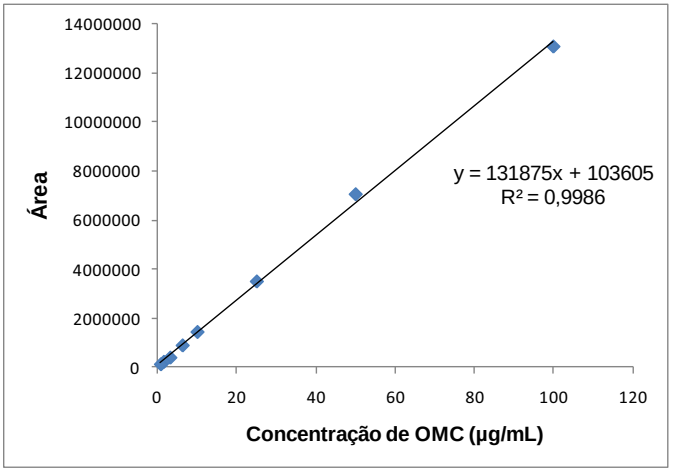


Figura 33. Curva analítica de OMC em isopropanol.

A curva analítica apresentou um coeficiente de correlação dentro do exigido pela RDC 899/2003 da ANVISA, e assim adequado para sua aplicação nos estudos deste trabalho. Além disso, o número de pontos utilizados para a construção desta curva esteve dentro do que é exigido pela ANVISA (mínimo, 5 concentrações diferentes) (BRASIL, 2003).

7.4.2 Precisão e exatidão

As Tabelas 7 e 8 mostram os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intradia e interdia respectivamente.

Tabela 7. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão intradia.

CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS (µg/mL)	CONCENTRAÇÕES OBTIDAS (µg/mL)	CV (%)	EXATIDÃO (%)
100	92,59 102,04 98,45	4,88	97,69
10	10,54 9,82 10,18	3,56	101,81
0,75	0,71 0,73 0,78	4,77	99,03

*CV: Coeficiente de Variação

Tabela 8. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão interdia.

CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS (µg/mL)	CONCENTRAÇÕES OBTIDAS (µg/mL)	CV (%)	EXATIDÃO (%)
100	92,59 102,04 98,45 97,22 99,32 104,78	4,06	98,10
10	10,54 9,82 10,18 9,79 10,65 9,97	3,89	101,96
0,75	0,71 0,73 0,78 0,74 0,70 0,71	4,15	97,15

*CV: Coeficiente de Variação

Os resultados obtidos foram considerados precisos e exatos para os testes de repetibilidade intradia e interdia uma vez que apresentaram coeficiente de variação menor que 15% para precisão e exatidão entre 80% e 120%, estando de acordo com o critério de aceitação proposto.

7.4.3 Robustez

As Tabelas 9, 10, 11 e 12 apresentam os valores obtidos para o estudo de robustez.

Tabela 9. Concentrações de OMC obtidas variando-se o fluxo nas condições cromatográficas.

Fluxo (mL/min)	Concentração obtida (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
1,5	10,35 10,15 9,96	1,91	101,50
1,6	9,97 9,99 10,40	1,99	100,50
1,7	9,88 10,39 10,10	2,55	101,23

Tabela 10. Concentrações de OMC obtidas variando-se a temperatura da coluna nas condições cromatográficas.

Temperatura (ºC)	Concentração obtida (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
34	10,14 9,68 10,10	2,55	99,73
35	9,97 9,99 10,40	3,36	103,38
36	9,97 10,23	1,28	101,11

Tabela 11. Concentrações de OMC obtidas variando-se a coluna nas condições cromatográficas.

Coluna C18	Concentração obtida (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
4,6x75mm	9,99 10,46 9,70	3,83	100,51
4,6x150mm	9,97 10,39 10,01	2,27	101,23

Tabela12. Concentrações de OMC obtidas variando-se o pH da fase móvel (água) nas condições cromatográficas.

pH	Concentração obtida (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
2,8	10,18 10,10 9,90	1,44	100,61
3	9,97 9,99 10,40	2,4	101,19
3,2	10,24 9,98 10,19	1,33	101,35

O método pode ser considerado robusto uma vez que os resultados obtidos apresentaram um coeficiente de variação menor que 15% e os valores estiveram entre 80% a 120% da concentração teórica do teste, conforme critério de aceitação proposto.

7.5 Validação do método para estudo de permeação e retenção cutânea

7.5.1 Especificidade de seletividade

Através da análise de especificidade e seletividade pode ser concluído que o solvente extrator (isopropanol), a solução receptora e a emulsão base não interferem na

identificação e quantificação do OMC uma vez que o pico cromatográfico analisado é atribuído apenas ao OMC.

7.5.1 Recuperação

A Tabela 13 apresenta valores médios de recuperação no estrato-córneo e na pele (epiderme e derme) restante.

Tabela 13. Concentrações de OMC obtidas no estudo de recuperação.

CONCENTRAÇÕES EC (µg/mL)	RECUPERAÇÃO EC (%)	CONCENTRAÇÕES ED (µg/mL)	RECUPERAÇÃO ED (%)
15,5 (CV 1,36%)	92,98	1,2 (CV 8,7%)	7,09

*EC: Estrato Córneo
ED: Epiderme-derme
CV: Coeficiente de Variação

Estes resultados comprovam a não ocorrência de perda significativa nem degradação da substância analisada, durante os procedimentos de retenção cutânea, uma vez que a substância consegue ser recuperada em quantidade significativa. Os valores obtidos para os testes de retenção cutânea, utilizados neste trabalho, não sofrem, portanto, influência do processo de recuperação da substância analisada e sim apenas das características da formulação e membrana utilizada.

7.5.2 Curva analítica em solução receptora

Os resultados obtidos para a construção da curva analítica em solução receptora estão representados na Figura 34.

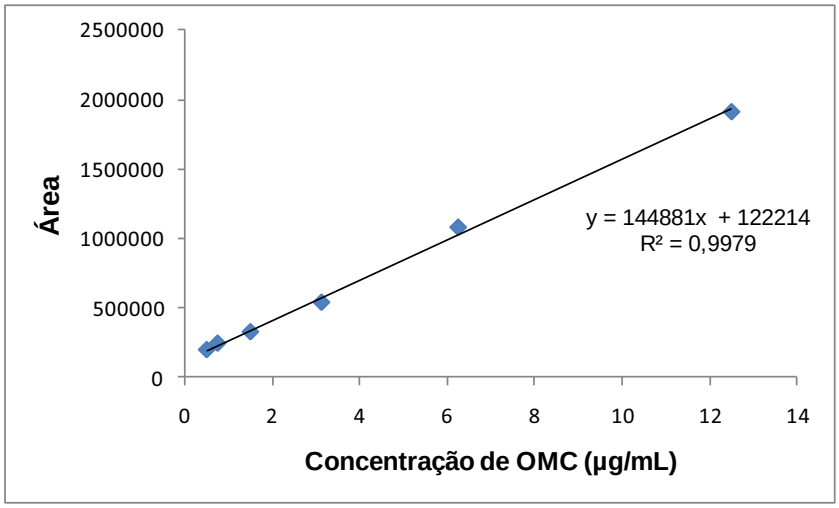


Figura 34. Curva analítica de OMC em solução receptora.

A curva apresentou coeficiente de correlação dentro do exigido pela legislação e, portanto, aceitável para a aplicação do método neste estudo (BRASIL, 2003).

As Tabelas 14 e 15 mostram os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intradia e interdia, em solução receptora, respectivamente:

Tabela 14. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão e exatidão intradia em solução receptora.

Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações obtidas (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
12,5	12,86 13,50 12,56	3,70	103,78
6,25	6,39 6,78 7,02	4,72	107,68
0,5	0,55 0,56 0,56	1,04	111,33

*CV: Coeficiente de Variação

Tabela 15. Concentrações de OMC obtidas no estudo de precisão e exatidão interdia em solução receptora.

Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações obtidas (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
12,5	12,86 13,50 12,56 13,03 12,89 12,66	3,04	103,62
6,25	6,39 6,78 7,02 6,89 6,56 6,24	3,76	107,65
0,5	0,55 0,56 0,56 0,53 0,57 0,51	4,12	109,33

*CV: Coeficiente de Variação

Os resultados foram considerados precisos e exatos uma vez que estiveram de acordo com os critérios de aceitação

7.5.3 Limite de detecção e quantificação

Foram obtidos os valores de 0,5µg/mL como limite de detecção e 1,4µg/mL como limite de quantificação.

A RDC 899/2003 da ANVISA não exige estes testes, todavia foram realizados para a garantia da real quantificação do OMC nos estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*, considerando a perspectiva de que os níveis de concentração do OMC seriam significativamente baixos.

7.6 Estudo de estabilidade das formulações

São vários os fatores que podem afetar a estabilidade de um produto, como cada componente da formulação, seja ativo ou não, processo de fabricação, material de acondicionamento e condições ambientais e de transporte. As alterações podem ser extrínsecas (fatores externos) ou intrínsecas (relacionados à formulação) (BRASIL, 2004).

Dentro do estudo de estabilidade existe a a Estabilidade Preliminar que objetiva orientar na escolha das formulações e nada mais é do que um teste realizado na fase inicial de desenvolvimento de um produto, em que são empregadas condições extremas (BRASIL, 2004).

O período de avaliação das formulações, dentro da estabilidade preliminar, pode variar conforme as especificações do produto, às características especiais de algum componente da formulação ou o sistema conservante utilizado. Além disso, os aspectos químicos a serem avaliados são: a integridade da estrutura química, o teor de ingredientes e outros parâmetros (BRASIL, 2004).

O estudo de estabilidade acelerada tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento e tem duração de 90 dias (BRASIL, 2004).

A ANVISA recomenda antes do início dos testes de estabilidade, que o produto seja submetido ao teste de centrifugação. A ocorrência de instabilidade, relacionada a separação de fases, pode ser indicativa de necessidade de reformulação. A não ocorrência indica que o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

Após o teste de centrifugação não se observou nenhuma instabilidade quanto à separação de fases, nas formulações F-B, F-1 e F-2 analisadas e, assim, puderam ser submetidas aos testes de estabilidade.

7.6.1 Estabilidade preliminar das formulações

7.6.1.1 Avaliação das características organolépticas

Não foi observada nenhuma alteração de aspecto, odor e cor nas três formulações analisadas (F-B, F-1 e F-2), em todas as condições, 25ºC (temperatura ambiente), –5 ºC (freezer), 5 ºC (geladeira), 45 ºC (estufa), luz indireta e ciclos de congelamento e descongelamento, durante o estudo de estabilidade preliminar.

7.6.1.2 Determinação do pH das formulações

Os valores de pH obtidos para as três formulações durante todo o estudo de estabilidade preliminar estão relacionados nas tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16. Valores de pH da F-B durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	5,91	5,91	5,91	5,91	5,91	5,91	**0,00**
2	5,91	5,84	5,85	5,87	5,87	5,90	**0,47**
3	5,91	5,85	5,85	5,88	5,88	5,91	**0,46**
4	5,91	5,90	5,93	5,94	5,96	5,96	**0,42**
5	5,90	5,94	5,85	5,84	5,88	5,86	**0,63**
6	5,90	5,84	5,83	5,87	5,86	5,86	**0,42**
7	5,84	5,84	5,85	5,85	5,82	5,85	**0,20**
8	5,90	5,87	5,85	5,84	5,82	5,85	**0,47**
9	5,84	5,85	5,86	5,86	5,98	5,95	**1,01**
10	5,97	5,89	5,83	5,90	5,86	5,98	**1,01**
11	5,97	5,87	5,84	5,81	5,86	5,99	**1,24**
12	5,98	5,89	5,84	5,81	5,82	5,89	**1,07**
13	5,86	5,88	5,85	5,83	5,88	5,97	**0,83**
14	5,84	5,85	5,85	5,84	5,86	5,97	**0,86**
15	5,86	5,88	5,85	5,83	5,81	5,87	**0,45**
CV	**0,79**	**0,50**	**0,47**	**0,63**	**0,83**	**0,86**	

Tabela 17. Valores de pH da F-1 durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	5,95	5,95	5,95	5,95	5,95	5,95	**0,00**
2	5,96	5,95	5,97	5,94	6,01	6,01	**0,50**
3	5,98	5,96	5,94	5,94	6,05	6,01	**0,73**
4	6,03	6,02	6,08	6,08	6,07	6,03	**0,46**
5	6,03	6,05	6,01	6,08	6,07	6,01	**0,50**
6	6,03	6,02	6,08	6,08	6,07	6,01	**0,53**
7	6,00	6,01	6,08	6,02	6,06	6,06	**0,54**
8	6,03	6,00	6,10	5,99	6,01	6,06	**0,69**
9	6,04	6,01	6,06	6,08	6,07	6,03	**0,44**
10	6,04	6,00	6,08	6,08	6,06	6,05	**0,49**
11	6,00	5,98	6,02	6,04	6,00	5,99	**0,36**
12	6,04	6,08	6,10	6,08	6,06	6,05	**0,37**
13	6,04	6,06	6,11	6,09	6,14	6,06	**0,61**
14	6,02	6,00	6,02	6,08	6,02	6,07	**0,53**
15	6,04	6,06	6,00	6,09	6,00	6,05	**0,58**
CV	**0,51**	**0,67**	**0,94**	**0,96**	**0,74**	**0,54**	

Tabela 18. Valores de pH da F-2 durante o estudo de estabilidade preliminar das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	5,98	**0,00**
2	5,97	6,00	5,98	6,14	6,07	6,08	**1,11**
3	5,97	6,00	6,10	6,00	6,10	6,08	**0,96**
4	6,07	6,02	6,15	6,25	6,24	5,99	**1,81**
5	6,07	6,02	6,12	6,20	6,20	5,99	**1,46**
6	6,07	6,00	6,15	6,26	6,24	6,00	**1,88**
7	6,02	6,09	6,13	6,22	6,22	6,08	**1,31**
8	6,02	6,09	6,10	6,22	6,24	6,06	**1,45**
9	6,06	6,12	6,15	6,25	6,24	6,09	**1,27**
10	6,00	6,10	6,05	5,95	6,10	6,13	**1,14**
11	6,00	6,07	6,05	5,97	6,07	6,03	**0,67**
12	5,98	6,08	6,00	5,97	6,19	6,03	**1,37**
13	5,90	5,98	6,06	6,08	6,08	6,00	**1,18**
14	5,89	6,08	6,06	6,08	6,08	6,00	**1,26**
15	5,91	5,98	6,06	6,08	6,08	6,00	**1,12**
CV	**1,01**	**0,83**	**0,97**	**1,91**	**1,39**	**0,78**	

As formulações F-B, F-1 e F-2 apresentaram desvio padrão muito baixo, em relação às médias dos pHs medidos, em todas as condições às quais foram submetidas durante o estudo de estabilidade preliminar, possuindo, portanto uma variação não significativa, o que sugere a estabilidade das mesmas quanto a este aspecto.

7.6.1.3 Análise da viscosidade

A viscosidade é a medida de resistência ao escoamento de um fluido e é um dos itens avaliados durante o estudo de estabilidade cosmética (BRASIL, 2004).

Nas Tabelas 19, 20 e 21 estão os valores das viscosidades aparentes mínimas para cada condição às quais foram submetidas as formulações durante os 15 dias de estabilidade preliminar.

Tabela 19. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-B (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	**0,00**
7	3,99	4,02	3,85	3,88	3,86	3,95	**1,83**
14	3,8	3,78	3,79	3,81	3,89	3,62	**2,34**
CV	**3,29**	**3,84**	**1,33**	**1,71**	**1,92**	**4,41**	

Tabela 20. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-1 (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	4,21	4,21	4,21	4,21	4,21	4,21	**0,00**
7	4,48	4,25	4,43	4,25	4,34	4,23	**2,43**
14	4,39	4,19	4,37	4,19	4,49	4,18	**3,08**
CV	**3,15**	**0,72**	**2,62**	**0,72**	**3,22**	**0,60**	

Tabela 21. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-2 (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CICLOS	CV
1	3,81	3,81	3,81	3,81	3,81	3,81	**0,00**
7	3,45	4,25	3,01	3,84	3,88	4,04	**11,92**
14	3,5	3,41	2,78	3,92	4,09	3,89	**13,30**
CV	**5,44**	**10,99**	**16,90**	**1,47**	**3,71**	**2,98**	

De acordo com o teste ANOVA não houve diferença estatística significativa entre os valores de viscosidade aparente mínima, obtidos para cada formulação, dentro de cada condição aplicada, em todos os dias de estabilidade preliminar, ou seja, a viscosidade não alterou, dentro de cada condição de estresse aplicada, com o decorrer do tempo.

7.6.2 Estabilidade acelerada das formulações

7.6.2.1 Avaliação das características organolépticas

Assim como durante o estudo de estabilidade preliminar, não foi observada nenhuma alteração de aspecto, odor e cor nas três formulações analisadas (F-B, F-1 e F-2), em todas as condições às quais foram submetidas, durante todo o estudo de estabilidade acelerada.

7.6.2.2 Determinação do pH das formulações

As medidas de pH foram feitas da mesma maneira que no estudo de estabilidade preliminar.

As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam os valores dos pHs obtidos, em todas as condições às quais foram submetidas as formulações, durante o estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 22. Valores de pH da F-B durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	5,95	5,95	5,95	5,95	5,95	**0,00**
7	5,90	5,88	5,90	5,90	5,88	**0,19**
15	5,98	5,88	5,94	5,90	5,90	**0,68**
21	5,90	5,88	5,83	5,83	5,88	**0,55**
35	5,86	5,90	5,83	5,85	5,88	**0,46**
45	5,86	5,87	5,82	5,85	5,91	**0,56**
60	5,88	5,88	5,85	5,82	5,88	**0,46**
90	5,86	5,88	5,85	5,83	5,88	**0,36**
CV	**0,76**	**0,44**	**0,88**	**0,78**	**0,43**	

Tabela 23. Valores de pH da F-1 durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	5,99	5,99	5,99	5,99	5,99	**0,00**
7	6,05	6,00	5,99	6,03	6,06	**0,51**
15	6,00	6,05	6,03	6,09	6,09	**0,64**
21	6,06	6,03	6,02	6,00	6,02	**0,36**
35	6,04	6,06	6,02	6,09	6,00	**0,58**
45	6,03	6,06	6,00	6,01	6,02	**0,38**
60	6,04	5,99	6,02	6,10	6,02	**0,68**
90	5,98	6,06	6,00	6,09	6,00	**0,77**
CV	**0,49**	**0,53**	**0,26**	**0,78**	**0,56**	

Tabela 24. Valores de pH da F-2 durante o estudo de estabilidade acelerada das formulações (Médias de três leituras de pH).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	6,02	6,02	6,02	6,02	6,02	**0,00**
7	6,00	6,05	6,09	6,18	6,16	**1,23**
15	6,04	6,00	6,05	6,11	6,14	**0,93**
21	5,89	6,00	6,06	6,08	6,11	**1,44**
35	5,89	5,98	6,06	6,12	6,08	**1,52**
45	5,89	6,10	6,06	6,08	6,08	**1,43**
60	5,89	5,98	6,13	6,08	6,08	**1,60**
90	5,89	6,00	6,06	6,08	6,08	**1,34**
CV	**1,15**	**0,68**	**0,53**	**0,75**	**0,71**	

Da mesma forma como durante o estudo de estabilidade preliminar, as formulações F-B, F-1 e F-2 apresentaram desvio padrão muito baixo, em relação às médias dos pH medidos, em todas as condições às quais foram submetidas durante o estudo de estabilidade acelerada, possuindo, portanto uma variação não significativa, constando estabilidade das mesmas quanto a este aspecto.

7.6.2.3 Análise da viscosidade

Também foram analisadas as viscosidades aparentes mínimas e as Tabelas 25, 26 e 27 apresentam os valores obtidos em cada uma das condições e durante os 90 dias de estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 25. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-B (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	3,79	3,79	3,79	3,79	3,79	**0,00**
7	4,04	4,08	3,89	3,90	3,87	**2,44**
14	3,88	3,88	3,82	3,83	3,99	**1,74**
21	4,10	3,80	3,98	4,06	3,88	**3,14**
45	4,07	4,24	4,18	4,10	4,05	**1,93**
60	3,99	4,03	4,04	3,99	4,14	**1,52**
90	4,45	3,98	3,62	4,24	4,34	**8,05**
CV	**5,17**	**4,09**	**4,69**	**4,01**	**4,70**	

Tabela 26. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-1 (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	**0,00**
7	4,52	4,26	4,47	4,29	4,37	**2,56**
14	4,48	4,20	4,44	4,17	4,55	**3,94**
21	4,25	4,16	4,50	4,30	4,86	**6,31**
45	4,69	4,37	4,73	4,77	4,81	**3,76**
60	4,41	4,61	5,08	4,73	4,42	**5,92**
90	3,89	4,30	4,13	4,38	4,38	**4,95**
CV	**5,90**	**3,47**	**6,96**	**5,41**	**5,15**	

Tabela 27. Valores de viscosidade aparente mínima (Pa.s) da F-2 (Médias de três leituras de viscosidade).

DIA	LUZ INDIRETA	(25 ± 2°C)	(45 ± 2 °C)	(5 ± 2°C)	(-5 ± 2°C)	CV
1	3,84	3,84	3,84	3,84	3,84	**0,00**
7	3,48	4,29	3,07	3,87	3,9	**12,46**
14	3,55	4,45	2,56	3,96	4,15	**19,63**
21	3,49	4,48	3,02	3,91	3,99	**14,57**
45	3,37	4,4	3,22	3,91	4,12	**13,12**
60	3,62	4,62	3,32	3,78	3,5	**13,40**
90	3,56	4,89	3,1	3,57	3,52	**18,20**
CV	**4,13**	**7,26**	**12,13**	**3,39**	**6,82**	

De acordo com o teste ANOVA não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos de viscosidade aparente mínima para as formulações, dentro de cada condição de estresse, durante todo o estudo de estabilidade acelerada.

7.7 Estudo de estabilidade do OMC

7.7.1 Estabilidade química preliminar do OMC

De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004), as condições de armazenamento mais comuns das amostras, nos testes de estabilidade, são: temperaturas ambiente, elevada e baixa, exposição à luz e ciclos de congelamento e descongelamento. Neste estudo de estabilidade química do OMC foram analisadas apenas as condições de temperatura ambiente, luz indireta e 45ºC, conforme citado anteriormente, em virtude do tempo de retenção do OMC, no cromatograma, ser bastante alto o que tornaria inviável a análise do teor deste filtro, em triplicata, em todas as condições de estresse sugeridas por este guia. Com isso foram escolhidas as condições de estresse de maior relevância ao estudo de estabilidade de filtros solares.

As Figuras 35 e 36 mostram os valores do teor de OMC obtidos durante o estudo de estabilidade química preliminar do mesmo.

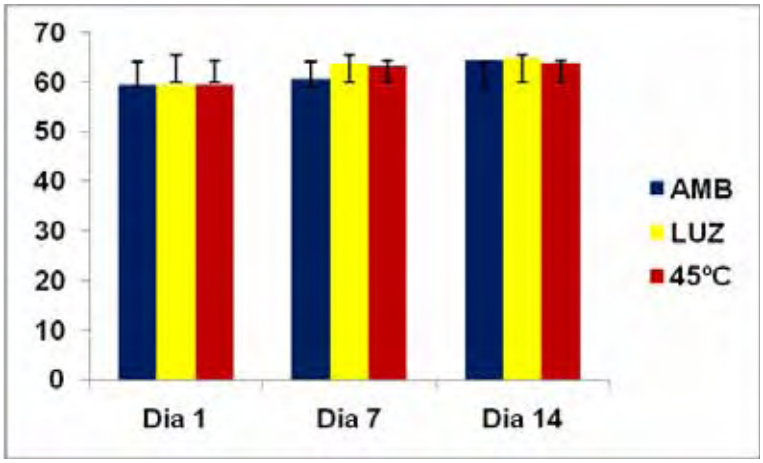


Figura 35. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-1 durante o estudo de estabilidade química preliminar.

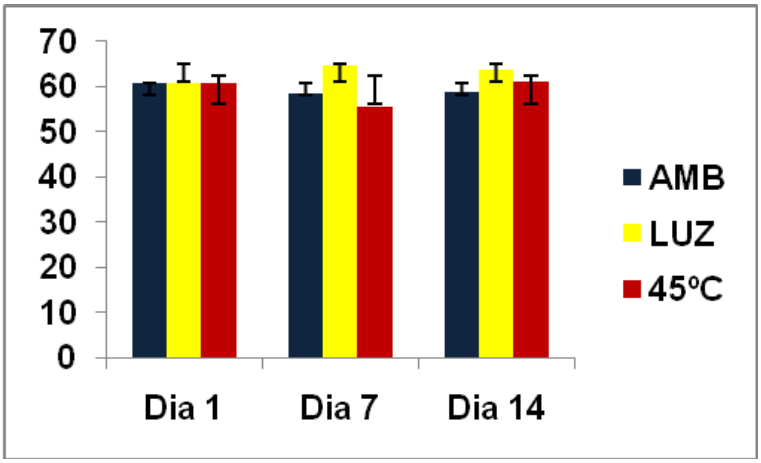


Figura 36. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-2 durante o estudo de estabilidade química preliminar.

Através da análise das Figuras 35 e 36 e pela análise de variância, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de teor de OMC nem entre as condições aplicadas, nem entre os dias de estudo. Esse resultado mostra, portanto, a estabilidade química do OMC nas condições estudadas.

7.7.2 Estabilidade química acelerada do OMC

Os valores do teor de OMC obtidos durante o estudo de estabilidade química acelerada estão representados nas Figuras 37 e 38:

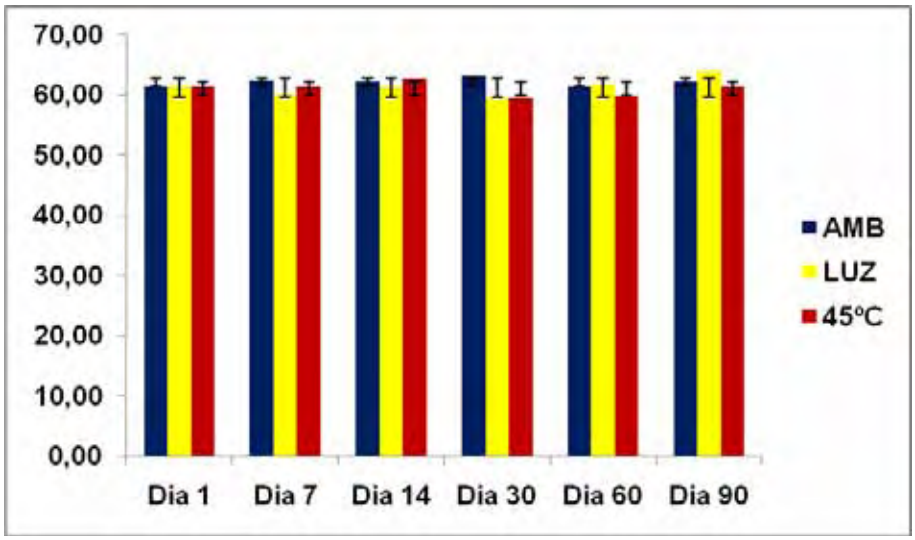


Figura 37. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-1 durante o estudo de estabilidade química acelerada.

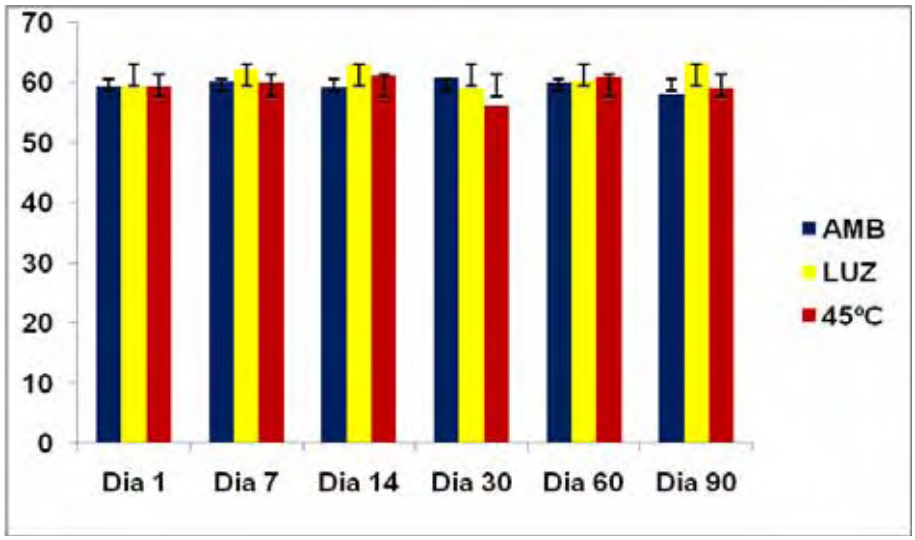


Figura 38. Teor de OMC (µg/mL) obtidos para a formulação F-2 durante o estudo de estabilidade química acelerada.

Com estes resultados pode-se concluir que o teor de OMC foi mantido mesmo nas situações de estresse às quais foram submetidas as formulações F-1 e F-2 durante o estudo de estabilidade química acelerada.

7.7.3.1 Análise do FPS (Fator de Proteção Solar) e manutenção do mesmo durante o estudo de estabilidade acelerada

Os valores obtidos de FPS para as formulações estão representados nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 28. Valores de FPS para a formulação F-1 (Médias de três medidas de FPS).

CONDIÇÕES	DIA 0	DIA 7	DIA 14	DIA 30	DIA 60	DIA 90	CV
T AMB	9,66	9,68	9,70	9,71	9,62	9,66	**0,34**
ESTUFA	9,66	9,59	9,66	9,69	9,66	9,71	**0,42**
LUZ	9,66	9,62	9,72	9,60	9,70	9,75	**0,61**
CV	**0,00**	**0,48**	**0,32**	**0,61**	**0,41**	**0,46**	

Tabela 29. Valores de FPS para a formulação F-2 (Médias de três medidas de FPS).

CONDIÇÕES	DIA 0	DIA 7	DIA 14	DIA 30	DIA 60	DIA 90	CV
T AMB	19,09	18,99	18,94	19,07	19,14	19,04	**0,38**
ESTUFA	19,09	19,09	18,95	19,16	19,11	19,13	**0,38**
LUZ	19,09	19,14	19,06	19,11	19,07	19,15	**0,19**
CV	**0,00**	**0,40**	**0,35**	**0,24**	**0,18**	**0,31**	

Através de análise estatística (ANOVA) os valores de FPS tanto para a F-1 quanto para a F-2 não apresentaram diferenças estatísticas significativas, dentro de cada condição de estresse e entre elas, com o passar do tempo.

A formulação F-2 apresentou FPS bem maior que a F-1, justificando, assim, a adição dos outros filtros solares.

Foi feita também uma análise com a formulação F-B e obteve-se um valor de FPS de 0,14, verificando-se, assim, que a emulsão base não contribui para o aumento de FPS das formulações estudadas.

7.8 Determinação da solução receptora para os estudos de liberação e permeação cutânea

A solução receptora deve permitir a manutenção da "sink condition", ou seja, o volume empregado deve ser cinco vezes maior que do ponto de saturação do ativo (ZATZ, 1995). De acordo com a OECD (2004), a escolha da solução tampão é mais adequada para substâncias hidrofílicas, sendo necessária, portanto, a adição de solubilizantes para substâncias lipofílicas. Dependendo da solubilidade do ativo, o meio receptor pode conter tensoativos. Assim é necessária a comprovação da solubilidade do ativo na solução receptora escolhida a fim de que ela não seja uma barreira ao processo de permeação. Além disso, a solução receptora deve ser compatível com a metodologia analítica de quantificação do ativo e não alterar a integridade da pele.

A solução receptora escolhida foi tampão fosfato pH 7,4 com 2% de Tween® 80, que permitiu a manutenção da condição "*sink",* não ocasionando aumento apreciável da concentração de OMC de modo a ocasionar redução do fluxo de difusão deste filtro solar do compartimento doador para o receptor.

7.9 Estudo da estabilidade do OMC na solução receptora escolhida

Os valores obtidos com as injeções feitas nos tempos de 2, 4, 6, 8 e 12h não apresentaram diferença estatística significativa, o que garantiu que não houve instabilidade do OMC na solução receptora mesmo após o contato de 12h.

7.10 Estudo de liberação do OMC nas formulações

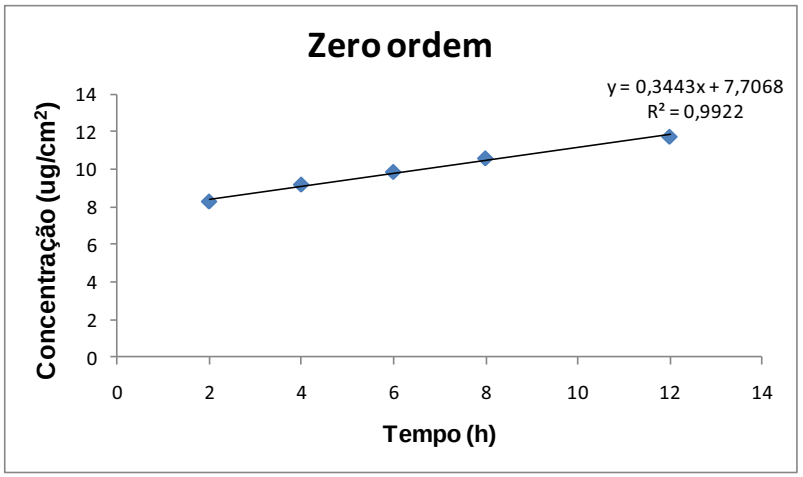
Os valores obtidos para o estudo de liberação estão representados na Tabela 30.

Tabela 30. Valores obtidos de OMC (μg/cm^2) no estudo de liberação das formulações F-1 e F-2. Valores expressos como média.

Tempo	Liberação F-1	Liberação F-2
2h	8,25	6,66
4h	9,16	7,58
6h	9,84	8,13
8h	10,57	8,94
12h	11,73	10,28

Através da análise estatística verificou-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre os valores de F-1 e F-2. Ou seja, a associação de filtros solares (F-2) não alterou a liberação do OMC.

Estes valores de liberação obtidos foram utilizados na construção de uma curva analítica para a verificação do melhor modelo de cinética de liberação para as formulações. O modelo que melhor se encaixou foi o de Zero ordem, para as duas formulações F-1 e F-2, uma vez que apresentou o melhor coeficiente de correlação, conforme mostram as Figuras 39 (F-1) e 40 (F-2).



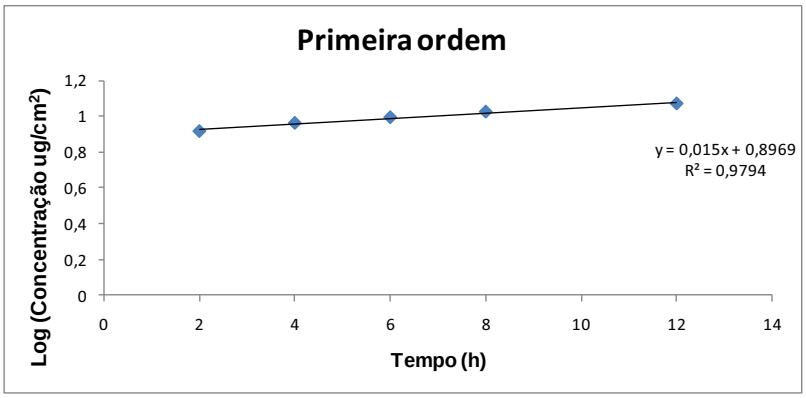
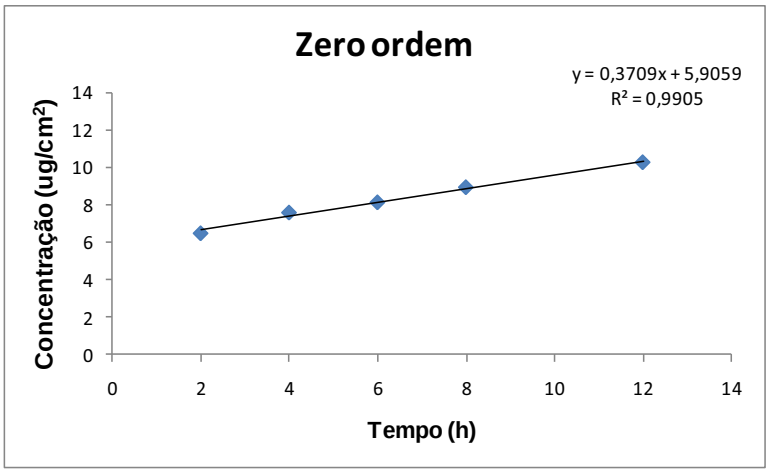


Figura 39. Representações gráficas dos modelos de cinética de liberação (F-1).



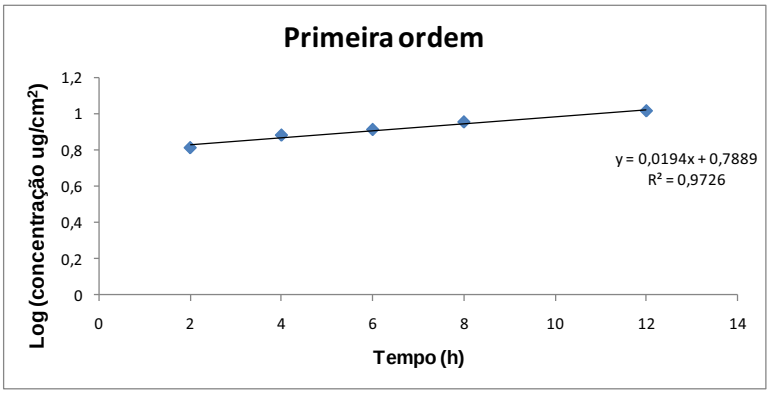


Figura 40. Representações gráficas dos modelos de cinética de liberação (F-2).

O modelo cinético de zero ordem se baseia na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam (VARELAS *et al.*, 1995).

7.11 Estudo de permeação cutânea *in vitro*

As vantagens dos métodos *in vitro* sobre os *in vivo* são que nos primeiros podem ser controladas as condições de estudo, não havendo os interferentes biológicos, além de não serem dispendiosos e facilmente realizáveis (ANSEL *et al.*, 2007). Nos estudos *in vitro* podem-se usar tanto peles humanas como as de espécies animais, sendo a pele de orelha de porco muito utilizada, por possuir características semelhantes às da pele humana (ANDEGA *et al.*, 2001).

A pele humana obtida de cirurgias de mama, ou a partir de cadáveres, Tb pode ser utilizdas, mas muitos pesquisadores têm realizado seus estudos usando peles animais

como modelo, sendo a de porco, estruturalmente mais próxima da humana, um das mais usadas (HORWITZ *et al.*, 1998).

As técnicas *in vitro* utilizam células de difusão, as quais consistem de um líquido receptor e uma fase doadora separadas por membrana sintética ou pele.

Quando solutos lipofílicos são investigados, como no caso de muitos filtros solares, modificadores de solubilidade são utilizados com o fluido receptor para promover uma adequada solubilidade e garantir as condições de penetração. (SARVEIJA *et al.*, 2004).

No estudo de permeação cutânea *in vitro*, as condições termodinâmicas devem ser mantidas para que o processo ocorra com eficiência. O veículo doador deve manter a membrana exposta a uma constante concentração do permeante, e a fase receptora cujas amostras são colhidas em intervalos de tempo pré-determinados, deve garantir condições termodinâmicas favoráveis ao fármaco (LÓPEZ *et al.*, 1998).

Os resultados do estudo de permeação cutânea estão relacionados na Figura 41.

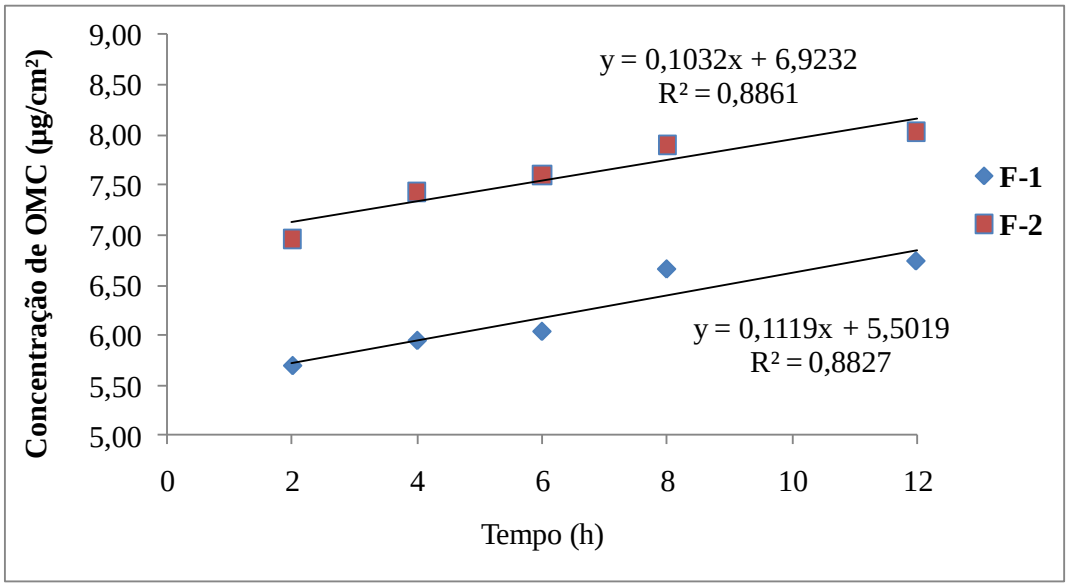


Figura 41. Permeação cutânea *in vitro* do OMC (F-1 e F-2).

Através do Mann-Whitney, verificou-se que existe diferença estatística significativa entre os valores de permeação obtidos as as formulações F-1 e F-2. Para a análise dos valores obtidos para cada formulação com o passar do tempo foi utilizado o ANOVA e verificou-se que para a F-1 não houve diferença estatística significativa entre o tempo de 2h e o restante, mostrando que a quantidade de OMC permeada se deu em 2h e depois se manteve. Já para a formulação F-2 a permeação se deu modo gradativo já que o estudo estatístico mostrou diferença entre os extremos de tempo.

Além disso, pode ser observado que a F-1 apresentou menor permeação e foi a formulação com maior viscosidade, de acordo com os estudos de curva de fluxo. Isso confirma o que foi relatado por POTTER *et al.* (1999) e CROSS *et al.* (2001): as taxas de permeação cutânea de filtros solares, presentes em formulações dotadas de maior viscosidade, foram menores.

A extrapolação dos resultados *in vitro* obtidos pelo teste de permeação pode ser útil para estimar as quantidades que teoricamente seriam absorvidas pelo organismo a partir da aplicação das formulações testadas sobre a pele humana.

A superfície corporal pode ser calculada através da equação 3 proposta por DUBOIS & DUBOIS (1916).

$$SC\ (m^2) = 0{,}007184 \times (\text{altura cm})^{0{,}725} \times (\text{peso kg})^{0{,}425} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde SC representa a superfície corpórea.

Desta forma, pode-se considerar que a superfície corpórea para um homem de 70Kg e 1,73m de altura é de 1,83 m^2, ou 18.300 cm^2.

Considerando que o valor médio de permeação do OMC, obtido para a formulação 1, foi de 6,74 ug/cm^2 no período de 12 horas e supondo que ocorra a

aplicação do filtro solar no corpo todo, a estimativa é de que a permeação neste indivíduo seja de aproximadamente 123.300 ug.

Pode-se estimar o volume sanguíneo deste indivíduo, considerando-se a relação de 75 mL/Kg. E, assim, para este homem de 70 Kg, o volume sanguíneo calculado é de 5.250 mL.

Desta forma, a concentração sanguínea esperada de OMC a partir da aplicação da formulação 1 sobre a pele, será de 23,5 ug/mL.

Para a formulação 2, cujo valor médio de permeação foi de 8 ug/cm^2, utilizando-se o mesmo raciocínio, o valor de OMC sanguíneo será de 28 ug/mL.

Conforme citado anteriormente, JANJUA *et al.* (2008) observaram níveis de OMC plasmáticos (7ng/mL-mulheres e 16ng/mL- homens) e urinários (6ng/mL-mulheres e 4ng/mL- homens) após aplicação tópica diária de 2 mg/cm^2 de uma formulação contendo 10% de OMC.

No presente trabalho, as concentrações plasmáticas calculadas de 23µg/mL (F-1) e 28µg/mL (F-2) estariam relacionadas à aplicação tópica de 141,24mg/ cm^2 de formulação contendo 5% de OMC, significativamente superiores e não proporcionais aos observados por JANJUA *et al*. (2008). No entanto, é preciso considerar que as concentrações plasmáticas foram estimadas a partir de estudos *in vitro*, e que estes valores ressaltam a possibilidade de que uma aplicação tópica destas formulações em sistemas biológicos pode levar a níveis plasmáticos significativos do filtro solar em questão.

KLAMMER *et al*. (2007) sugeriram que o OMC possui efeitos sobre o sistema endócrino; no entanto, pouco se conhece sobre as relações entre concentrações plasmáticas do OMC e seus efeitos tóxicos.

Assim, a possibilidade de absorção do produto evidenciada pelos estudos *in vitro* realizados neste trabalho leva-nos à preocupação da possibilidade de ocorrência destes efeitos em usuários de protetores solares e, desta forma, considera-se de fundamental importância a condução de estudos *in vivo*.

7.12 Estudo de retenção cutânea *in vitro.*

Em geral, a quantidade de estrato córneo removido por *tape stripping* depende de uma variedade de parâmetros como tipo do adesivo usado bem como as diferenças na estrutura do estrato córneo inter-indivíduos e inter-sazonais (BASHIR *et al.*, 2001). Além disso, o veículo utilizado na aplicação pode ter um efeito significativo na coesão entre os corneócitos e na adesão entre os mesmos e a fita adesiva (JACOBI *et al.*, 2005).

As Figuras 42 e 43 relacionam os valores obtidos com os ensaios de retenção cutânea *in vitro*:

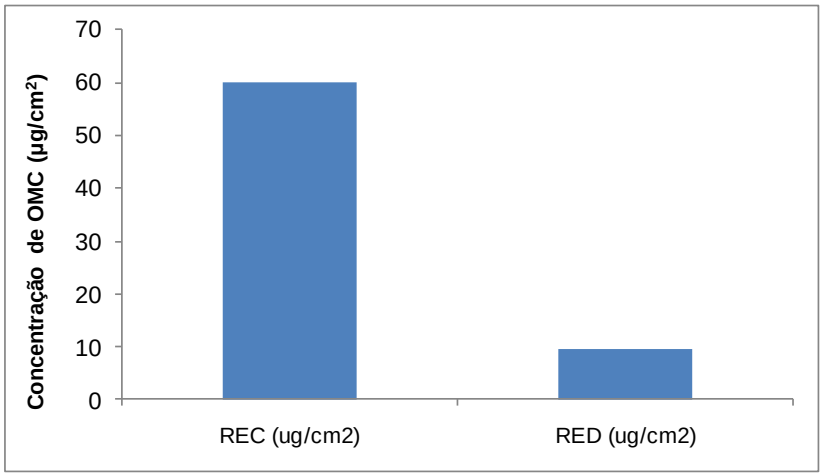


Figura 42. Estudo de retenção cutânea da formulação F-1.

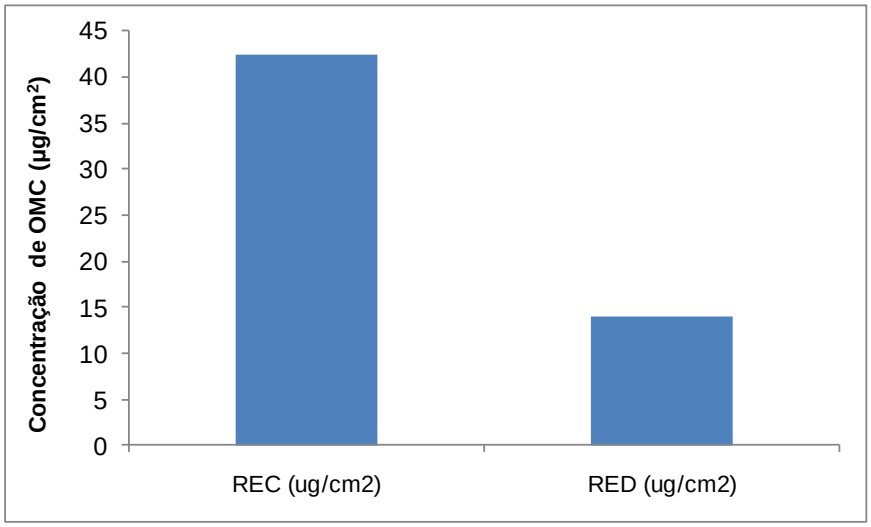


Figura 43. Estudo de retenção cutânea da formulação F-2.

Estes resultados mostram que as formulações ficaram mais retidas no estrato córneo e isso corrobora com a idéia de alguns autores. LAZAR *et al*., (1996) observaram que a deposição de filtro solar no estrato córneo da emulsão o/a foi três vezes maior do que a emulsão a/o. Segundo JI ANG *et al*., (1998), o sítio de ação desejável dos filtros solares é restrito à superfície da pele ou entre somente as camadas superiores do estrato córneo. A quantidade penetrada de filtros UV, de acordo com JACOBI *et al.* (2004), deve remanescer nas camadas mais externas do estrato córneo. Seria ideal que os filtros solares impregnassem no estrato córneo formando uma barreira aos raios UV, mas que não chegassem à tecidos mais profundos (VARVARESOU, 2005).

Todavia de acordo com os resultados obtidos a associação de filtros solares, presente na F-2, diminuiu a retenção cutânea do OMC no estrato córneo, o que, no contexto de proteção solar dito pelos autores acima citados, não é um bom resultado uma vez que pode comprometer a proteção frente aos raios solares.

A inovação em termos de associação de filtros solares, aumentou o FPS nas condições experimentais do presente trabalho, todavia, como conseqüência, houve o

aumento da permeação cutânea dos mesmos. Isso abre expectativas para continuação do trabalho, principalmente seguindo-se com estudos *in vivo.*

8. CONCLUSÕES

- As formulações estudadas apresentaram comportamento de estabilidade e liberação do OMC semelhantes, independente da associação de filtros solares.
- A retenção *in vitro* no estrato córneo foi diminuída na associação de filtros solares, o que é inconveniente para a função de proteção solar proposta para o produto.
- A associação de filtros solares aumentou significativamente a permeação *in vitro* do OMC, evidenciando a necessidade da condução de estudos *in vivo* para avaliação dos riscos de absorção significativa do produto que poderiam resultar em efeitos sistêmicos indesejáveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **Journal of Controlled Release**. USA, v.77, n. 1, p.17-25, 2001.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6° ed., São Paulo: Editorial Premier, p. 398-400, 2007.

ANTONIOU, C.; KOSMADAKI, M. G.; STRATIGOS, A. J.; KATSAMBAS, A. D. Sunscreens – what's important to know. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v.22, n. 9, p. 1110-1119, 2008.

BARRY, B.W. Dermatological Formulations: Percutaneous absorption. **England: Marcel Dekker**, INC, p.1-233, 351-407, 1983.

BASHIR, S.J., CHEW, A.-L., ANIGBOGU, A., DREHER, F. and MAIBACH, H.I. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. **Skin Research and Technology**, v.**7**, p. 40–48, 2001.

BERG, A. O. Counseling to prevent skin cancer: recommendations and rationale. **Am J. Nurs**., v. 104, n.4, p. 87-90, 2004. Disponível em http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi. Acesso em 31 mai. 2008.

Brasil. Ministério da saúde. Portaria 2.466 de 31 de agosto de 2010.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Série Qualidade 1, 2004.

BRIDGES, B.A. UV-induced mutations and skin cancer: how important is the link? **Mutation Res**., v. 422, p. 23-30, 1998.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD,V.; DOUCET,J.; TRANCHANT, J-T.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Rel**., v. 60, p.67-76, 1999.

CEFALI, L.C. **Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à acdeleração do envelhecimento cutâneo**: 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PASCUAL-MARTÍ, M.C. Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in sunscreen

formulations by flow injection-isodifferential derivative ultraviolet spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 428, p. 183–190, 2001.

COLEPICOLO, P.; GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova,** v. 30, 2007.

CORREA, M. A.; DAVOLOS, J.F.; DAVOLOS M. R. Protetores Solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO Jr, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Ver. Bras. Ciên. Farm**., v.41, n.1, p.73-78, 2005.

CROSS, S. E., JIANG, R., BENSON, H. A. E., ROBERTS, M. S. Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone? **J Invest Dermatol.**, v. 117, p. 147-50, 2001.

DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotion. In: **Newburguer's manual of cosmetic analysis.** Washington: Association of Official Analytical Chemists, Senzel, AJ, p.32, 1977.

DE PAOLA, M.V. Princípios de formulação de protetores solares. **Cosmetics and Toiletries** (Ed. português), v. 13, p. 74-81, 2001.

DIFFEY, B. Sunscreen isn't enough. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, p. 105-108, 2001.

DUBOIS, D.; DUBOIS, E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch. Intern. Med**., v. 17, p. 862, 1916.

DUPUIS, D., ROUGIER, A., ROGUET, R., LOTTE, C. The measurement of the SC reservoir: A simple method to predict the influence of vehicles on In-vivo percutaneous absorption. **Br. J. Dermatol**., v. 115, p. 233-238, 1986.

EPSTEIN,J.H. Biological efect of sunlight**.** In LOWE, NJ& SHAAT, NASunscreens: development , evaluation and regulatory aspect. **Marcel Dekker**, New York, 1990

FORSLIND, B.; ENGSTRÖM, S.; ENGBLOM, J.; NORLÉN, L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. **Journal of Dermatological Science. Sweden**, v. 14, n. 2, p. 115-125, 1997.

FLOR, J.; DAVOLOS. M.R. & CORREA. M.A. Protetores Solares. *Quím.Nova, v.* 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FREITAS, Z. M. F.; GONÇALVES, J. C. S.; SANTOS, E. P.; VERGANINI, A. Glyceridic esters of p-methoxycinnamic acid. A new sunscreen of the cinnamate class. **Int J of Cosmetic Sci**, v. 23, p. 147-152, 2001.

GOLDSTEIN, M. Recuperação do DNA e Fotoenvelhecimento. **Cosmetics & Toiletries,** v. 20, p. 48-51, 2008.

GUPTA,V.K.; ZATZ, J.L.; REREK,M. Percutaneous Absorption of Sunscreens Through Micro-Yucatan Pig Skin *In Vitro.* **Pharmaceutical Research,** v.16, p.1602-1607, 1999.

HAGEDORN-LEWEKE, U., LIPPOLD, B.C. Absorption of sunscreens and other compounds through human skin in vivo: derivation of a method to predict maximum fluxes. **Pharm**., v-12, p.1354–1360, 1995.

HAYDEN, C.G., ROBERTS, M.S., BENSON, H.A.E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **Lancet**, v-350, p.863–864, 1997.
HERBERT, A.A. Photoprotection in children. **Adv. Dermatol.,** v.8, 309-324, 1983.

HORWITZ, E. TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**. Israel, v. 1-3, n. 56, p.7-21, 1998.

HUONG, S.P. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. **J. Photochem. Photobiol A Chem**., v. 186, n. 1, p. 65-70, 2007.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T.. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21- 39, 2003.

JACOBI,U.;WEIGAMANN,H.J.;BAUMANN,M.;REICHE,A.I.;STERRY,W.;LADEM A NN,J. Lateral spreading of topically applied UV filters substances investigated by tape stripping. **Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol.,** v. 17,p. 17-22,2004.

JACOBI,U.;KAISER,M.;RICHTER,H.;AUDRING,H.;STERRY,W.;LADEMANN,J. The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes. **Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol.,**v.18,p.175-179, 2005.

JANJUA, N. R.; KONGSHOJ, B.; ANDERSSON, A. M.; WULF, H. C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. **JEADV**, v. 22, p. 456-461, 2008.

JIANG,R.; BENZON,H.A.E.; CROSS,S.E.; ROBERTS,M.S. In vitro human epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents. **Pharm. Res**., v.15, p.1863- 1868, 1998.

JIANG, R., Roberts, M.S., COLLINS, D.M., BENSON, H.A.E.Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. **Br. J. Clin. Pharmacol**., v-48, p.635–637, 1999.

JUNQUIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. Tradução da histología básica.** 8° ed., Rio de Janeiro: Editoria Guanabara Koogan, 1995.

KLAMMER, H.; SCHLECHT, C.; WUTTKE, W.; SCHMUTZLER, C.; GOTTHARDT, I.; KOHRLE, J.; JARRY, H. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-tyroid functions in rats. **Toxicology**, v. 238, p. 192-199, 2007.

KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: a wonderful marrige. **Cosm. & Toilet.** v.117, n.5, p. 30-34, New York, 2002.

LAZAR,G.M.; BAILEET, FRUCTUS,A.E.; BATTANDIER,J.A.; FERRIER,D.; MARTY, J.P. Evaluation of In vitro percutaneous absorption of UV filters used in sunscreen formulations. **Drug Cosmet. Ind.,** v. 158, p.50-62, 1996.

LÓPEZ, A.; FAUS, V.; DIEZ-SALES, O.; HERRÁEZ, M. Skin permeation model of phenyl alcohols: comparison of experimental conditions. **International Journal of Pharmaceutics**. Spain, v.173, n. 1-2, p. 183-191, 1998.

LÉPORI, L.R. Miniatlas: a pele. 1ª ed., São Paulo: Soriak, 2002.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K. *et al*. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **J. Invest. Dermatol**., v. 117, n. 2, p. 256-262, 2001.

MANSUR J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Derm.,** v. 61, n. 4, p. 121-124, 1986.

MARTIN, A.N.; SWARBRICK, J.; CAMARATA, A. **Physical Pharmacy**, 2nd edition, Filadelphia: ed. by Lea and Friberg, cap.17, 1969.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. P.153-476.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de Fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 81 – 87, 2002.

MONGIAT, S.; HERZOG, B.; DESHAYES, C.; KONIG, P.; OSTERWALDER, U. BEMT: An efficient broad- spectrum UV filter. **Cosmetics & Toiletries.** v. 118, n. 2, p. 1-5, 2003.

MONTEIRO, L.M.. Formerly Acta Farmacéutica Bonaerense. **Lat. Am. J. Pharm**. v. 26, n. 2, p. 179-84, 2007.

MONTENEGRO, L.; CARBONE, C.; PAOLINO, D.; DRAGO, R.; STANCAMPIANO, A. H.; PUGLISI, G. In vitro skin permeation of sunscreen agents from O/W emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, v- 30, p. 57–65, 2008.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and Risk of organic ultraviolet filters. **Regul. Toxicol. Pharm**. v.33, p.285-299, 2001.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhacement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. Iran, v. 250, n 2, p. 359-369, 2003.

NORLING, T.; LADING, P. ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol**., v. 19, p. 687-692, 1992.

OECD-ENVIRONMENT DIRECTORATE, JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY. Guidance for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment. n. 28, 05 mar, 2004.

ORSI, D.DE; GIANNINI, G.; PORRÀ, R.; BERRI, S.; BOLASCO, A.; CARPANI, I.; TONELLI, D. Simple Extraction and HPLC Dtermination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products. **Chromatographia**. v. 64, p. 509-515, 2006.

OZER, O.; MENEMENLIOGLU, D.; ERTAN, G. Photostability of menthyl anthranilate in different formulations. **Cosm. & Toil**., v. 116, p. 67-72. 2001.

POTARD, G., LAUGEL, C., SCHAEFER, H., MARTY, J.P. The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol**., v-13, p.336–344, 2000.

POTTER, D., BOOTH, E. D., BRANDT, H. C. A., Studies on the dermal and systemic bioavailability of polycyclic aromatic compounds in high viscosity oil products. **Arch Toxicol.,** v. 73, p. 129-40, 1999;

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkinau, v.1, p.600, 1996.

Radiação Ultravioleta. Camada de Ozônio e Saúde Humana. INPE, 2010. Disponível em http://satelite.cptec.inpe.br/uv/. Acesso em: 18 de dezembro de 2010.

ROY, C.R. *et al*. The measurement of solar ultraviolet radiation. **Mutation Res**., v. 422, p. 7-14, 1998.

SAYRE, M.R.; STANFIELD, J.; LOTT, D.L.; DOWDY, J.C. Simplified method to substantiate SPF labeling for sunscreen products. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 19, p. 254–260, 2003.

SANTOS, O. D. H. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética *in vivo* de emulsões de óleo de *Calendula officinalis* com cristal líquido:** 2006. 133 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS, R. de J. Filtros solares. **Aerosol & Cosméticos.** v. 53, p. 48-55, 1987.

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

SASSON, Clarice Scliar. **Influência dos Veículos Cosméticos na Permeação Cutânea da Associação de Filtros Solares e Acetato de Tocoferol**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Área de Insumos, medicamentos e correlatos, Universidade Federal do Paraná.

SCHAEFER, H., RIEDELMAYER, T. E. Skin barrier: Principlesof Percutaneous Absorption. **Karger, Basel, Switzerland**. pp. 118–128, 1996.

SCHLUMPF, M.; SCHMID, P.; DURRER, S.; CONSCIENCE, M.; MAERKEL, K.; HENSELER, M.; GRUETTER, M.; HERZOG, I.; REOLON, S.; CECCATELLI,R.; FAASS, O.; STUTZ, H. J.; WUTTKE, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters- an update. **Toxicology**, v. 205, p. 113-122, 2004.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria- Fundamentos teóricos e práticos.** 2ª ed., Rio de Janeiro: Editora Artliber, 2006.

SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

SCOTT, H. Reology. In: Remington (Ed). **The science and practice of parmacy.** 20nd ed., Philadelphia: Editora Lippincoot, cap.23, p.335-355, 2000.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento Cutâneo á Luz da Cosmetologia- Estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção**. São Paulo: Tecnopress Editora, 2003.

SPRINGSTEEN, A; YUREK, R.; FRAZIER, M. *et al*. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreen by diffuse transmittance. **Anal. Chim. Acta**, v. 380, p. 155-164, 1999.

SOUZA, V., M. **Ativos dermatológicos.** 1ª ed., São Paulo: Tecnopress Editora, v. 1, 2005.

STEVENSON, C.; DAVIES, R.J.H. Photosensitization of Guanine-Specific DNA Damage by 2-Phenylbenzimidazole and the Sunscreen Agent 2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic Acid. **Chem. Res. Toxicol**., v. 12, p. 38-45, 1999.

SUSANA, M. Fotoproteção-Sua História. Disponível em www.sbdba.org.br. Acesso em 12 de novembro de 2008.

TOKUMOTO, M.S. **Evolução estrutural durante a transição sol-gel em suspensões coloidais aquosas de SnO_2: abordagem reológica**: 1996. Dissertação (Mestrado) –

Instituto de Química Campus de Araraquara, Universidade estadual Paulista, Araraquara.

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

TOVO, L.F. Radiação UV e fotodano cutâneo. IX Seminário para Comemoração do Dia Internacional de Proteção da Camada de Ozônio. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2004. Disponível em http://www.ambiente.sp.gov.br/. Acesso em 15 de dezembro de 2010.

TREFFEL, P., GABARD, B. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. **Pharm. Res**., v-13, p.770–774, 1996.

TSAI, C., HSU, L., FANG, J., LINN, H. H. Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. **Biol Pharm Bul**. v. 22, p. 397-401, 1999.

UVA e UVB: o que você precisa saber. Disponível em http://www.loreal-paris.com.br/artigos/uva-e-uvb-o-que-voce-precisa-saber.aspx. Acesso em 15 de dezembro de 2010.

VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v. 5, p. 53–57, 2005.

WATKINSON, A.C., BRAIN, K.R., WALTERS, K.A. HADGRAFT, J. Prediction of the percutaneous penetration of ultra-violet filters used in sunscreen formulations**. Int. J. Cosmet. Sci**. v. 13, p. 265–275, 1992.

ZATZ, J.L. Drug release from semisolids: effect membrane permeability on sensitivity to product parameters. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 787- 789, 1995.