

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

**Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e  
eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***

Daniela D'Almeida Peres

Tese para obtenção do Título de  
**DOUTOR**

**Orientador:**  
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo  
2015

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

**Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e  
eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***

Daniela D'Almeida Peres

Versão Original

Tese para obtenção do Título de  
**DOUTOR**

**Orientador:**  
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo  
2015

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Peres, Daniela D'Almeida  
P437a    Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia  
multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* / Daniela D'Almeida  
Peres. -- São Paulo, 2015.  
109p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Baby, André Rolim

1. Fator de proteção solar : Cosmetologia 2. Filtro solar 3.  
Antioxidantes I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.

668.55 CDD

Daniela D'Almeida Peres

Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e  
eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. André Rolim Baby  
Orientador / Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

## *Dedicatória*

*Aos meus amados pais, Solange e Ramiro, por serem meu alicerce e maiores incentivadores. Não existem palavras para demonstrar meu amor e gratidão!*

*Aos meus queridos avós, Eunice, Albertino e Diamantina, pelo amor incondicional e por moldarem o meu caráter.*

*Aos meus queridos bisavós, João e Lúcia (in memoriam), por me ensinarem o valor da família e do trabalho. Meus exemplos de vida! Saudades sempre...*

*Ao meu amado namorado, Rodrigo, pelo amor, cumplicidade, parceria e por me tornar uma pessoa melhor a cada dia.*

## **Agradecimentos**

*À Deus, Jesus Cristo, Maria, todos os Anjos e Santos, pela constante proteção, plenitude e paz de espírito.*

*À minha linda família, incluindo os membros de quatro patas, pelo amor, união e muitas alegrias e incentivos!*

*Ao meu orientador, educador e querido amigo, Prof. Dr. André Rolim Baby, pelos ensinamentos, crescimento e valores compartilhados. Não apenas um orientador, mas um professor exemplar! Serei eternamente grata!*

*À querida Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco, pela parceria e carinho.*

*À Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi e Profa. Dra. Letícia Norma Carpentieri Rodrigues, pelos valiosos ensinamentos durante o exame de qualificação.*

*A todos os professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, que muito me ensinaram durante as disciplinas, reuniões e representação discente.*

*Aos maravilhosos amigos de laboratório, não apenas pelos ensinamentos científicos, mas, principalmente pelos conselhos, alegrias, lágrimas, experiências, carinho e amizade: Ana Lúcia, André, Camila, Danielle, Débora, Fabiana, Fernanda, Franciele, Gabriela, Karina, Larissa, Margarida, Maíra, Mariana Guimarães, Mariana Pires, Mayara, Michelli, Mirla, Nicole, Paula, Priscila, Thalita, Thamires, Victoria, Viviane e Vitor. Obrigada por tudo!*

*Aos amados amigos off-lab, por me ensinarem que é possível ter irmãos, mesmo sendo filha única: André, Camila, Deborah, Natália, Paula e Victor.*

*Aos técnicos e queridos amigos, **Claudinéia e Edgar**, pelo apoio e carinho.*

*Aos funcionários da FCF-USP: **David, Doralice, Elizabete, Elaine, Irineu, Jorge, Mirian e Sueli**, pela enorme competência e suporte.*

*À **Fabiana Inácio**, pela grande ajuda com as análises microbiológicas.*

*À **Larissa Picolo e Karina Nakagawa**, pela paciência, carinho, competência e enorme ajuda com os ensaios de tape stripping e estudo de estabilidade. Vejo um futuro brilhante à frente de vocês, queridas!*

*À **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**, em especial à **Fernanda Sarruf**, pela parceria na realização dos ensaios *in vivo*.*

*Às empresas **Croda, Volp e Seppic**, pelo fornecimento de amostras.*

*Ao **CNPq, CAPES e FAPESP**, pelos auxílios financeiros, diretos e indiretos, para a realização desta pesquisa.*

*À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, pelo acolhimento, estrutura, ensinamentos, e por ser meu segundo lar nesses onze anos de formação.*

*E a todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.*

**Muito obrigada!!!**

## *Epígrafe*

*Don't you worry... you'll find yourself.  
Follow you heart and nothing else.  
And you can do this, if you try.  
All that I want for you my son,  
is to be satisfied.  
And be a simple kind of man.  
Be something you love and understand.  
(Simple Man - Lynyrd Skynyrd)*



## RESUMO

PERES, D.A. **Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo***. 2015. 109f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A conscientização da população com relação aos malefícios da radiação ultravioleta (UV) levaram à adoção de hábitos preventivos, com destaque para a utilização diária de formulações fotoprotetoras. Ainda que os filtros solares tradicionais sejam efetivos na absorção ou reflexão da radiação UV, sabe-se que a sua atuação contra os radicais livres é limitada, fator que exige a incorporação de compostos antioxidantes às preparações, visando proteção cutânea de excelência. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento e avaliação de formulações multifuncionais contendo os filtros solares bemotrizinol e octil triazona, acrescidos do composto bioativo ácido ferúlico – reconhecido pelas suas propriedades antioxidante e fotoprotetora. As formulações foram desenvolvidas de acordo com um delineamento experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*) e avaliadas por meio de metodologias *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* para determinação de sua eficácia fotoprotetora e potencial antioxidante. As emulsões foram consideradas estáveis, seguras, com valor de pH biocompatível com a pele e viscosidade aparente adequada ao uso proposto. O delineamento experimental comprovou o potencial antioxidante e fotoprotetor do ácido ferúlico, visto que a presença deste promoveu aumento de até 90% na atividade antioxidante *in vitro* das formulações, bem como acréscimo de 32% no Fator de Proteção Solar (FPS) *in vivo* e 24% no Fator de Proteção UVA (UVA-PF). Por meio do ensaio *ex vivo*, a formulação contendo o ácido ferúlico apresentou tendência em aumentar a atividade antioxidante natural da pele, comparativamente à formulação contendo apenas os filtros solares e à pele não tratada; ademais, houve queda no potencial antioxidante da pele após a exposição à radiação UV, enfatizando a necessidade de proteção cutânea frente aos danos oxidativos. Os resultados comprovaram os efeitos antioxidante e fotoprotetor combinados do ácido ferúlico, em especial quando em sinergismo com filtros solares, tornando o composto bioativo um candidato promissor no desenvolvimento de formulações multifuncionais inovadoras, seguras e eficazes contra os efeitos nocivos decorrentes da exposição solar.

**Palavras-chave:** Ácido ferúlico. Atividade antioxidante. Delineamento experimental. Fotoproteção. *Tape stripping*.

## ABSTRACT

PERES, D.A. **Ferulic acid in sunscreens: development and multifunctional effectiveness *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo***. 2015. 109f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The public awareness regarding the harmful effects of ultraviolet (UV) radiation led to preventive habits, especially the daily use of sunscreens. Although traditional solar filters are effective in UV radiation absorption or reflection, it is known that their activity against free radicals is restricted, an aspect that requires the incorporation of antioxidants to preparations, aiming superior skin protection. Here, we developed and evaluated multifunctional formulations containing the sunscreens bemotrizinol and ethylhexyl triazone plus the bioactive compound ferulic acid - known for its antioxidant and photoprotective properties. Formulations were developed according to a factorial experimental design (*DoE 2<sup>3</sup>*) and evaluated using *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* methods to determine its photoprotective effectiveness and antioxidant potential. The emulsions were considered stable, safe, with pH value biocompatible with the skin and apparent viscosity suitable for the proposed use. The experimental design evidenced the photoprotective and antioxidant potential of ferulic acid, once its presence increased to 90% the *in vitro* antioxidant activity of the formulations, as well as 32% increase in the *in vivo* Sun Protection Factor (SPF) and 24% increase in the UVA Protection Factor (UVA-PF). Through the *ex vivo* assay, the formulation containing ferulic acid tended to increase the natural antioxidant activity of the skin, compared to the formulation containing only UV filters or the untreated skin; moreover, there was a decrease in the antioxidant potential of the skin after UV radiation exposure, emphasizing the need for skin protection against oxidative damage. The results confirmed the antioxidant and photoprotective effects of ferulic acid, especially when in synergy with UV filters, making the bioactive compound a promising candidate in the development of innovative, safe and effective multifunctional formulations against the harmful effects of sun exposure.

**Key-words:** Antioxidant activity. Experimental design. Ferulic acid. Photoprotection. *Tape stripping*.

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1:** Mecanismo de ressonância e absorção do ácido *p*-amino benzoico (SHAATH; 2010) .....5
- Figura 2:** Estrutura química do filtro octil triazona (TUCHINDA *et al.*, 2006) .....7
- Figura 3:** Estrutura química do filtro bemotrizinol (TUCHINDA *et al.*, 2006) .....7
- Figura 4:** Ilustração do *design* ótico do espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (adaptado de SPRINGSTEEN *et al.*, 1999) ..... 10
- Figura 5:** Radicais livres e a cadeia de reações envolvida no estresse oxidativo (adaptado de CHEN; HU; WANG, 2012) ..... 11
- Figura 6:** Redução da molécula de DPPH por substâncias antioxidantes (adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2013)..... 14
- Figura 7:** Estrutura química dos isômeros *cis* e *trans* do ácido ferúlico (adaptado de URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013)..... 18
- Figura 8:** Mecanismo de ressonância e de estabilização do radical fenoxila proveniente do ácido ferúlico (PAIVA *et al.*, 2013).....20
- Figura 9:** Mapa de distribuição eletrônica do ácido ferúlico, representando os orbitais HOMO e LUMO (adaptado de URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013) 21
- Figura 10:** Prevenção da formação de eritema devido à aplicação tópica de vitaminas e ácido ferúlico (adaptado de LIN *et al.*, 2005) .....22
- Figura 11:** Esquema de demarcação e aplicação das formulações no antebraço dos participantes, previamente à técnica de *tape stripping*.....42

<b>Figura 12:</b> Absorbância das soluções metanólicas de DPPH• a 515 nm, em diferentes concentrações (10 a 100 µM).....	48
<b>Figura 13:</b> Cinética de reação entre o ácido ferúlico e o DPPH•.....	49
<b>Figura 14:</b> Varredura espectrofotométrica das soluções aquosas de ácido ferúlico (50 µM) em diferentes valores de pH .....	53
<b>Figura 15:</b> Formulações fotoprotetoras após teste de Centrifugação .....	55
<b>Figura 16:</b> Formulações fotoprotetoras após teste de Estresse Térmico.....	56
<b>Figura 17:</b> Gráfico de efeitos principais para atividade antioxidante dos fotoprotetores multifuncionais .....	60
<b>Figura 18:</b> Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na atividade antioxidante dos fotoprotetores .....	61
<b>Figura 19:</b> Gráficos de contorno relativos à análise de atividade antioxidante	62
<b>Figura 20:</b> Gráfico de resíduos do ensaio da atividade antioxidante.....	64
<b>Figura 21:</b> Gráfico de efeitos principais representando o efeito de cada variável na transmitância da radiação UVB.....	65
<b>Figura 22:</b> Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na transmitância da radiação UVB.....	66
<b>Figura 23:</b> Gráficos de contorno relativos à transmitância da radiação UVB ...	67
<b>Figura 24:</b> Gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVB pelos fotoprotetores multifuncionais.....	68

<b>Figura 25:</b> Gráfico de efeitos principais representando o efeito de cada variável na transmitância da radiação UVA.....	69
<b>Figura 26:</b> Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na transmitância da radiação UVA.....	70
<b>Figura 27:</b> Gráficos de contorno relativos à transmitância da radiação UVA ...	71
<b>Figura 28:</b> Gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVA pelos fotoprotetores multifuncionais.....	72
<b>Figura 29:</b> Atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras.....	74
<b>Figura 30:</b> Curvas de absorvância dos fotoprotetores multifuncionais, mensuradas entre 290 e 400 nm (UVB e UVA) .....	76
<b>Figura 31:</b> Curvas da absorvância dos fotoprotetores multifuncionais, mensuradas entre 290 e 400 nm, antes e após irradiação .....	79
<b>Figura 32:</b> Rotas de degradação térmica do ácido ferúlico (adaptado de COGHE <i>et al.</i> , 2004; GRAF, 1992).....	83
<b>Figura 33:</b> Atividade antioxidante (%) das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias .....	84
<b>Figura 34:</b> Valor de FPS estimado das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias.....	85
<b>Figura 35:</b> Comprimento de onda crítico das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias .....	87
<b>Figura 36:</b> Microfotografias da primeira fita adesiva removida no ensaio de <i>tape stripping</i> , de acordo com a área de aplicação (aumento de 200 vezes) .....	92

## RELAÇÃO DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Principais filtros solares utilizados em formulações fotoprotetoras, com seus espectros de ação (PALM; O'DONOGHUE, 2007).....	6
<b>Quadro 2:</b> Mecanismo de desativação de radicais livres por substâncias antioxidantes (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013).....	13
<b>Quadro 3:</b> Equipamentos e afins utilizados nesta pesquisa.....	26
<b>Quadro 4:</b> Matérias-primas utilizadas nesta pesquisa .....	27
<b>Quadro 5:</b> Reagentes e solventes empregados.....	28

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Delineamento experimental do tipo fatorial ( <i>DoE</i> 2 <sup>3</sup> ) aplicado no desenvolvimento das formulações fotoprotetoras .....	29
<b>Tabela 2:</b> Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações fotoprotetoras multifuncionais .....	31
<b>Tabela 3:</b> Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea.....	41
<b>Tabela 4:</b> Atividade antioxidante das soluções metanólicas do ácido ferúlico, em diferentes concentrações.....	50
<b>Tabela 5:</b> Atividade antioxidante das soluções aquosas do ácido ferúlico em diferentes valores de pH.....	51
<b>Tabela 6:</b> Características organolépticas das formulações fotoprotetoras submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar .....	55
<b>Tabela 7:</b> Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras multifuncionais.....	57
<b>Tabela 8:</b> Valores de FPS e comprimento de onda crítico <i>in vitro</i> dos fotoprotetores multifuncionais .....	75
<b>Tabela 9:</b> Caracterização funcional <i>in vitro</i> das formulações fotoprotetoras, antes e após irradiação UV artificial.....	78
<b>Tabela 10:</b> Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações submetidas a estudo de estabilidade de 90 dias.....	82
<b>Tabela 11:</b> Avaliação microbiológica das formulações em estudo.....	89
<b>Tabela 12:</b> Ensaio de segurança <i>in vivo</i> das formulações.....	90

**Tabela 13:** Atividade antioxidante da epiderme, tratada ou não, com as formulações fotoprotetoras.....92

**Tabela 14:** Fator de Proteção Solar (FPS) *in vivo* das formulações fotoprotetoras .....94

**Tabela 15:** Fator de Proteção UVA (UVA-PF) das formulações fotoprotetoras95



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b><math>\lambda</math> crit</b>	-	Comprimento de onda crítico
<b>Abs</b>	-	Absorbância
<b>ANVISA</b>	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BHA</b>	-	Butil hidroxil anisol
<b>BHT</b>	-	Butil hidroxil tolueno
<b>CEP</b>	-	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CIE</b>	-	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
<b>CONEP</b>	-	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
<b>cP</b>	-	centiPoise
<b>DEM</b>	-	Dose Eritematogênica Mínima
<b>DNA</b>	-	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
<b>DoE</b>	-	<i>Design of Experiments</i>
<b>EEP</b>	-	Estudo de Estabilidade Preliminar
<b>EROs</b>	-	Espécies reativas de oxigênio
<b>FDA</b>	-	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FPS</b>	-	Fator de Proteção Solar
<b>HOMO</b>	-	Orbital molecular ocupado de maior energia
<b>INCI</b>	-	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
<b>LUMO</b>	-	Orbital molecular desocupado de menor energia
<b>O/A</b>	-	Óleo em água
<b>PABA</b>	-	Ácido <i>p</i> -amino benzoico
<b>pH</b>	-	Potencial hidrogeniônico
<b>pKa</b>	-	Potencial de ionização
<b>PMMA</b>	-	Polimetilmetacrilato
<b>PPD</b>	-	<i>Persistent Pigment Darkening</i>
<b>SOD</b>	-	Superóxido dismutase
<b>TCLE</b>	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UV</b>	-	Ultravioleta
<b>UVA-PF</b>	-	Fator de Proteção UVA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	2
2.1. Radiação ultravioleta	2
2.2. Estratégias de proteção solar	3
2.2.1. Avaliação da eficácia fotoprotetora	9
2.3. Estresse oxidativo e Atividade antioxidante	11
2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante	14
2.4. Protetores solares multifuncionais	16
2.5. Ácido ferúlico	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
4.1. Materiais	26
4.2. Atividade antioxidante do ácido ferúlico isolado	28
4.3. Desenvolvimento das formulações multifuncionais	29
4.3.1. Estabilidade Preliminar das formulações	33
4.4. Caracterização física e físico-química das formulações	33
4.5. Análise do delineamento experimental do tipo fatorial ( <i>DoE 2<sup>3</sup></i> )	34
4.6. Caracterização funcional <i>in vitro</i> das formulações	34
4.6.1. Atividade antioxidante	34
4.6.2. Eficácia fotoprotetora	35
4.6.3. Fotoestabilidade	36
4.7. Estudo de Estabilidade das formulações	37
4.8. Ensaio <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> – aspectos legais e éticos	37
4.9. Ensaio de Segurança das formulações	39
4.10. Caracterização funcional <i>ex vivo</i> das formulações	42
4.11. Caracterização funcional <i>in vivo</i> das formulações	44
4.12. Análise estatística dos resultados	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
5.1. Atividade antioxidante do ácido ferúlico isolado	47
5.1.1. Condições analíticas	47
5.1.2. Atividade antioxidante	49

5.2.	Desenvolvimento das formulações multifuncionais .....	54
5.2.1.	Estabilidade Preliminar das formulações .....	54
5.3.	Caracterização física e físico-química das formulações.....	56
5.4.	Análise do Delineamento Experimental do tipo fatorial ( <i>DoE 2<sup>3</sup></i> ).....	59
5.4.1.	Atividade Antioxidante.....	60
5.4.2.	Porcentagem de transmitância da radiação UVB (%TUVB).....	64
5.4.3.	Porcentagem de transmitância da radiação UVA (%TUVA).....	69
5.5.	Caracterização funcional <i>in vitro</i> das formulações .....	73
5.5.1.	Atividade antioxidante .....	73
5.5.2.	Eficácia fotoprotetora .....	75
5.5.3.	Fotoestabilidade.....	77
5.6.	Estudo de Estabilidade das formulações .....	81
5.7.	Ensaio de segurança das formulações.....	88
5.8.	Caracterização funcional <i>ex vivo</i> das formulações.....	91
5.9.	Caracterização funcional <i>in vivo</i> das formulações.....	94
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>101</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>110</b>

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

A conscientização quanto à prevenção frente aos efeitos deletérios da radiação ultravioleta (UV) desencadeia o avanço expressivo na pesquisa por medidas de fotoproteção efetivas e acessíveis. Sabendo-se que filtros solares isolados são capazes de absorver e/ou refletir apenas parte da radiação UV, a seleção e avaliação dos componentes ativos das preparações, assim como suas interações quando em combinação, exercem grande impacto sobre a segurança e funcionalidade de formulações fotoprotetoras (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Visando ampliar o desempenho desta classe cosmética, os compostos bioativos se apresentam como candidatos promissores, devido às suas características antioxidantes e protetoras cutâneas, atuando, pois, em sinergismo com os filtros solares tradicionais. Dentre os compostos bioativos disponíveis para uso tópico e em concordância com as propriedades antes descritas, o ácido ferúlico ocupa posição de destaque, atuando no combate aos radicais livres e protegendo a pele contra a radiação UV e formação de eritemas (LIN *et al.*, 2005).

O ácido ferúlico é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, podendo ser encontrado nas mais variadas fontes naturais. Esta substância possui resultados comprovados na terapêutica de diversas patologias, devido, em especial, à sua atividade antioxidante, responsável pelas suas principais aplicações (SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2009).

O perfil promissor do ácido ferúlico quando empregado em preparações fotoprotetoras multifuncionais se caracteriza, em especial, pela possibilidade de diminuição da quantidade de filtros solares sintéticos atualmente utilizados, fator que contribui significativamente para o desenvolvimento e comercialização de produtos inovadores e competitivos, com eficácia e segurança diferenciada frente aos efeitos nocivos promovidos pela exposição à radiação solar (JANSEN *et al.*, 2013b).

A proposta do presente projeto envolveu o emprego do ácido ferúlico no desenvolvimento de emulsões fotoprotetoras de caráter multifuncional. As formulações foram avaliadas por meio de recomendadas metodologias, com destaque para a avaliação *in vitro* e *in vivo* da eficácia fotoprotetora e a determinação do potencial antioxidante *ex vivo* da epiderme, visando confirmar o sinergismo entre o composto bioativo e filtros solares tradicionais na obtenção de formulações com potencial antioxidante e fotoprotetor de excelência.

# *Revisão de Literatura*

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Radiação ultravioleta

O Sol é essencial para a vida dos seres humanos, participando de processos bioquímicos e metabólicos diversos e colaborando na manutenção da saúde e bem-estar da população. No entanto, a exposição constante e não protegida à radiação pode causar variados malefícios (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

A radiação solar inclui as radiações infravermelha, visível e ultravioleta (UV), sendo a última responsável pelos principais efeitos deletérios cutâneos. Embora a pele possua antioxidantes endógenos e enzimas de reparo de DNA – mecanismos responsáveis por minimizar os danos causados pela radiação UV – a exposição solar em excesso pode levar a lesões agudas e crônicas (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

A radiação UV abrange a faixa de comprimento de onda de 100 a 400 nm e é didaticamente dividida em UVC (100 a 290 nm), UVB (290 a 320 nm), UVA II (320 a 340 nm) e UVA I (340 a 400 nm) (DIFFEY *et al.*, 2000). Devido a fenômenos, como o espalhamento por moléculas de nitrogênio, de oxigênio e a absorção pela camada de ozônio, a radiação UVC, extremamente energética e mutagênica, não atinge a superfície terrestre. No entanto, cuidados com os efeitos nocivos da exposição ao Sol devem ser tomados, já que as demais faixas de radiação UV não são completamente absorvidas (HÖNIGSMANN, 2002; LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007).

A radiação UVB penetra a epiderme, causando eritema e atuando diretamente no DNA celular, podendo ocasionar, em longo prazo, mutações e predisposição ao câncer de pele, além de inflamação e imunossupressão devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A partir da radiação UVA, é possível observar danos em camadas mais profundas da pele, devido ao seu maior poder penetrante. Dentre as principais alterações, são citadas modificações no tecido conjuntivo presente na derme, formação de EROs e danos ao DNA, todos com efeito comprovado no fotoenvelhecimento e câncer de pele, dentre outros (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012; LEVI, 2013; SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Estudos comprovaram que os três tipos de câncer de pele mais recorrentes – carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma – são causados por exposição excessiva à radiação solar (ARMSTRONG; KRICKER, 2001). A radiação UV, além de induzir mutações no DNA celular, também influencia a capacidade do sistema imune em identificar células cancerosas, colaborando para a sua multiplicação desordenada, primeiro passo na formação de tumores malignos (JANSEN *et al.*, 2013b).

Com relação ao fotoenvelhecimento, a radiação UVA tem efeito mais pronunciado, comparativamente à radiação UVB (JANSEN *et al.*, 2013b). Dentre os efeitos causados pela exposição à radiação UV, citam-se o aparecimento de rugas, sardas e a perda de elasticidade, causados pelos danos aos lipídeos e proteínas estruturais (queratina, colágeno e elastina) presentes na epiderme e derme (LEVI, 2013).

Outro efeito adverso da exposição à radiação UV é o eritema, ou queimadura solar que, por provocar os quatro sinais clássicos da inflamação – edema, vermelhidão, calor e dor – pode ser classificado como uma reação inflamatória cutânea. A radiação UVB é a sua principal causadora, devido ao seu maior potencial energético e seu baixo poder penetrante, atuando principalmente nas camadas basais da epiderme (HÖNIGSMANN, 2002).

Por fim, devido à exposição solar, diversos mecanismos celulares podem ser alterados, entre eles, os processos inflamatórios e a formação de radicais livres por estresse oxidativo. Em indivíduos susceptíveis, a exposição diária à radiação UV, mesmo que em níveis normais, pode provocar reações de fototoxicidade, em especial quando associada a uso de medicamentos (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012). Ainda, observam-se reações de fotossensibilização secundária, provocadas por danos oxidativos, em casos de exposição à radiação UVAI, de comprimento de onda longo (HÖNIGSMANN, 2002).

## **2.2. Estratégias de proteção solar**

Atualmente, a população tem acesso a maior quantidade de informações com relação aos efeitos deletérios da radiação UV; porém, este conhecimento muitas vezes não se transforma em ação, já que muitas pessoas ainda praticam comportamentos de risco durante a exposição ao Sol (CESTARI;



OLIVEIRA; BOZA, 2012). Isso se traduz em impactos econômicos, uma vez que bilhões de dólares são gastos anualmente em tratamentos de câncer de pele e fotoenvelhecimento (LEVI, 2013).

Ainda que parte da população não se proteja adequadamente, o organismo humano apresenta mecanismos de proteção endógenos contra a radiação UV. A principal defesa são os cromóforos, moléculas responsáveis pela conversão da energia absorvida em calor, com destaque para a melanina e ácidos nucleicos. Adicionalmente, são citados a remoção de radicais livres por antioxidantes endógenos, e o espessamento da camada córnea, como defesas complementares e efetivas no combate a radiação UV (JANSEN *et al.*, 2013b).

A proteção endógena da pele, embora fundamental, pode ser insuficiente em casos de exposição excessiva à radiação UV. Considerando este cenário, medidas fotoprotetoras adicionais devem ser adotadas, como o uso de roupas e acessórios (chapéus, óculos escuros e guarda-sóis) para o bloqueio físico da radiação UV e, principalmente, a fotoeducação e aplicação diária e correta de formulações fotoprotetoras, reconhecidas como as medidas profiláticas mais eficientes no combate à radiação solar (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

As formulações fotoprotetoras apresentam substâncias ativas que atuam na superfície da pele, envolvendo dois mecanismos distintos, em geral: absorção (filtros orgânicos ou químicos) ou reflexão (filtros inorgânicos ou físicos) da radiação UV (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados, contendo grupamentos aceptores e doadores de elétrons. Por meio de um mecanismo de ressonância, os filtros químicos são capazes de absorver a radiação UV e reduzir sua energia, dissipando-a na forma de calor, menos agressivo ao organismo. O tipo de substituinte e sua posição no anel aromático são os responsáveis pelos diferentes padrões de absorção observados para cada filtro orgânico (JANSEN *et al.*, 2013a). A **Figura 1** apresenta o mecanismo de ressonância do ácido *p*-amino benzoico (PABA), estrutura base para diversas classes de filtros solares.

**Figura 1:** Mecanismo de ressonância e absorção do ácido *p*-amino benzoico (SHAATH; 2010)



Os filtros inorgânicos são óxidos metálicos que agem por reflexão ou espalhamento da radiação UV. Estes compostos encontram-se dispersos nas formulações e são os principais responsáveis pela opacidade e coloração branca dos fotoprotetores. Ainda que os filtros inorgânicos sejam eficazes e seguros, com raros casos de fotossensibilização ou fotoalergias, a sua aceitabilidade cosmética se torna um impeditivo para sua ampla utilização (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Embora diversas moléculas estejam disponíveis no mercado, efeitos como a segurança, fotoinstabilidade e aceitabilidade cosmética de determinados filtros ainda impedem seu uso indiscriminado em formulações cosméticas, seja de forma isolada ou em associação com demais compostos (KOCKLER *et al.*, 2012). Outro entrave ao desenvolvimento de formulações fotoprotetoras é o baixo número de moléculas regularmente aprovadas, especialmente com absorção na faixa da radiação UVA, o que limita as combinações de filtros para a obtenção de formulações de amplo espectro – com proteção concomitante frente às radiações UVA e UVB (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

Os principais filtros solares aprovados mundialmente, bem como seus respectivos espectros de absorção, estão listados no **Quadro 1**.

**Quadro 1:** Principais filtros solares utilizados em formulações fotoprotetoras, com seus espectros de ação (PALM; O'DONOGHUE, 2007)

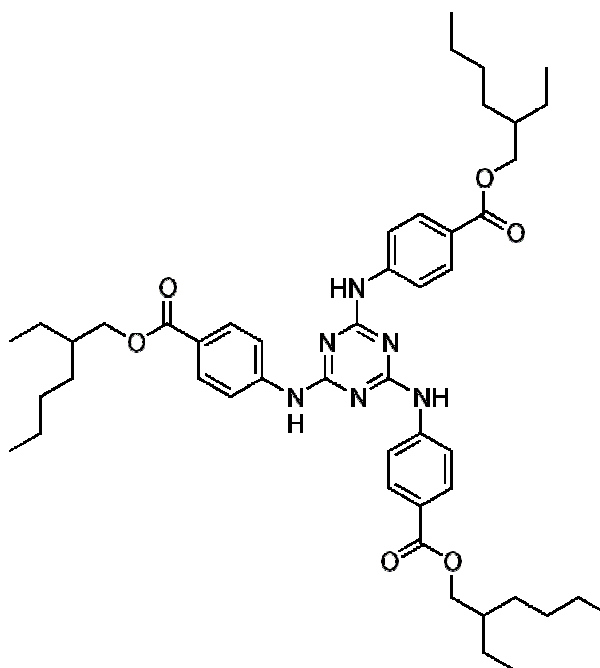
<b>Filtro Solar</b>	<b>Nomenclatura INCI</b>	<b>Espectro de Ação</b>
Octil dimetil PABA	<i>Ethyl hexyl dimethyl PABA</i>	UVB
Metoxicinamato de octila	<i>Ethyl hexyl methoxycinnamate</i>	UVB
Salicilato de octila	<i>Ethyl hexyl salicylate</i>	UVB
Octocrileno	<i>Octocrylene</i>	UVB
Benzofenona-3	<i>Benzophenone-3</i>	UVA II / UVB
Avobenzona	<i>Butyl methoxy dibenzoylmethane</i>	UVA I
Dióxido de titânio	<i>Titanium dioxide</i>	UVA / UVB
Óxido de zinco	<i>Zinc oxide</i>	UVA / UVB

**Legenda:** Nomenclatura conforme INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*).

Visando contornar os efeitos responsáveis pela baixa adesão dos consumidores ao uso diário de fotoprotetores, novas abordagens ressaltam-se como promissoras no desenvolvimento das formulações, com destaque para a síntese de novos filtros orgânicos, com segurança, eficácia e sensorial aprimorados (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Dentre os filtros solares desenvolvidos recentemente, citam-se os compostos octil triazona e bemotrizinol: moléculas fotoestabilizadas, com baixa permeação cutânea e elevada eficácia, características ideais para a preparação de fotoprotetores (TUCHINDA *et al.*, 2006).

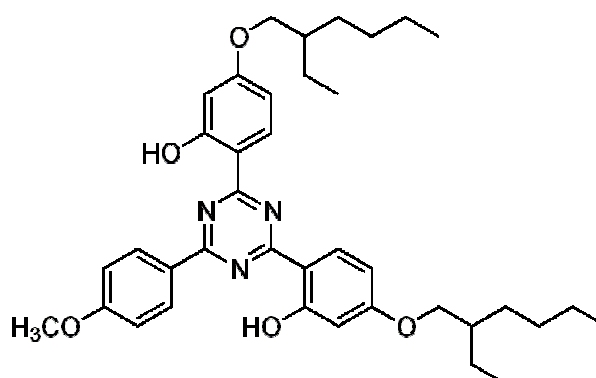
O filtro octil triazona, também conhecido pelo nome comercial de Uvinul® T150, é uma molécula com potencial de absorção na região do UVB e alta absorvidade molar a 314 nm. Apresenta natureza polar e estrutura que combina a molécula do ácido *p*-amino benzoico (PABA) com um anel triazina (TUCHINDA *et al.*, 2006). Sua estrutura química e espectro de absorção estão ilustrados na **Figura 2**.

**Figura 2:** Estrutura química do filtro octil triazona (TUCHINDA *et al.*, 2006)



O filtro bemotrizinol, também conhecido pelo nome comercial de Tinosorb® S, é uma molécula com absorção de amplo espectro e alta absorvidade molar a 310 e 343 nm, abrangendo, inclusive, a região do UVA I. Sua estrutura contém um grupamento hidroxifenil triazina e dois grupamentos hidroxila que permitem o fenômeno de tautomerismo, responsável pela rápida liberação de energia pela molécula após a absorção da radiação UV (TUCHINDA *et al.*, 2006; WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Sua estrutura química e espectro de absorção se encontram na **Figura 3**.

**Figura 3:** Estrutura química do filtro bemotrizinol (TUCHINDA *et al.*, 2006)



Os filtros anteriormente descritos são permitidos na União Europeia e Brasil, com concentrações máximas de uso de 5,0% (p/p) para a octil triazona e 10,0% (p/p) para o bemotrizinol. Ainda que as moléculas apresentem segurança e eficácia comprovada, seu uso ainda não é aprovado pela agência regulatória americana, o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). Perante esta agência, os filtros estão em fase de avaliação e apresentaram resultados satisfatórios em primeira análise, o que favorece o seu processo de aprovação (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

No mercado existem protetores solares nas mais diversas formas cosméticas de apresentação, sendo as emulsões do tipo óleo em água (O/A) as mais comumente encontradas. Devido à sua versatilidade em veicular compostos de diversas polaridades, é possível selecionar o sistema de filtros e excipientes mais adequados à obtenção de formulações com melhor sensorial, eficácia e segurança (TANNER, 2006).

Contudo, tão importante quanto o desenvolvimento, é o modo como os consumidores utilizam os fotoprotetores. De forma geral, três falhas são cometidas durante a aplicação das formulações: aplicação não uniforme; ausência de reaplicação; e aplicação em quantidades reduzidas, todas responsáveis pela diminuição da eficácia fotoprotetora (TANNER, 2006).

Ou-Yang e colaboradores (2012) avaliaram a relação entre a quantidade de fotoprotetor aplicada e os valores de Fator de Proteção Solar (FPS) obtidos em estudos de eficácia *in vivo*, obtendo-se relação linear entre as duas variáveis. Sabendo-se que os ensaios validados para a avaliação de eficácia fotoprotetora utilizam quantidades controladas de formulação (2,0 mg/cm<sup>2</sup> de pele), comprovou-se que a proteção solar obtida pelos consumidores foi inferior àquela indicada nos rótulos dos produtos de mercado, visto que estudos epidemiológicos demonstraram que a média de aplicação de fotoprotetores pela população está no intervalo de 0,5 a 1,0 mg/cm<sup>2</sup> (TANNER, 2006).

Finalmente, ainda que alguns estudos tenham demonstrado os efeitos negativos dos fotoprotetores, entre eles casos de dermatite de contato, absorção sistêmica e alterações na síntese de vitamina D, há comprovação de que os seus benefícios superam os inconvenientes e, portanto, seu uso deve ser incentivado por políticas de saúde pública, visando a prevenção dos danos causados pela radiação solar (LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007).

### 2.2.1. Avaliação da eficácia fotoprotetora

Atualmente, existem técnicas *in vitro* e *in vivo* para avaliação da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas. Os principais parâmetros avaliados são o Fator de Proteção Solar (FPS), responsável por medir a proteção contra a radiação UVB; o Fator de Proteção UVA (UVA-PF), responsável por indicar o nível de proteção contra a radiação UVA; e o comprimento de onda crítico ( $\lambda$  crit), que fornece a amplitude de proteção considerando o espectro completo da radiação UV (UNITED STATES, 2011). Pela Legislação Brasileira, uma formulação pode ser classificada como fotoprotetora apenas se apresentar FPS acima de 6, com comprimento de onda crítico acima de 370 nm, e UVA-PF equivalente a, no mínimo, 1/3 do FPS (BRASIL, 2012b).

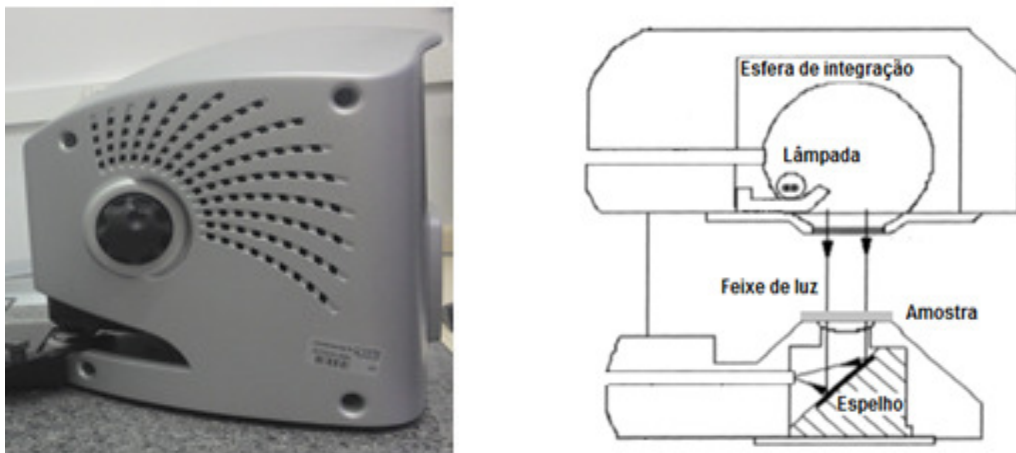
O ensaio para determinação do FPS é realizado *in vivo* com voluntários, uma vez que nenhuma metodologia *in vitro* se encontra validada para esta avaliação. O teste se baseia na habilidade de uma substância em proteger a pele de voluntários contra o eritema, principal efeito provocado pela radiação UVB. O FPS é definido como o quociente entre a dose eritematogênica mínima (DEM) na pele de voluntários protegida com o protetor solar, e a DEM na pele ausente de proteção, sendo o DEM a quantidade de energia emitida pelo simulador solar UV (expressa em Joules/cm<sup>2</sup>) requerida para a produção da primeira reação eritematogênica perceptível e com bordas claramente definidas. O espectro gerado pelo simulador solar UV é filtrado e propicia emissão no intervalo de 290 a 400 nm, com limite de 1500 W/m<sup>2</sup> no total da irradiação (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

A avaliação da fotoproteção UVA pode ser determinada por meio de ensaios *in vivo*, pelo método de avaliação do PPD (do inglês, *Persistent Pigment Darkening*). Este método é similar ao ensaio de FPS, porém com avaliação de reações pigmentogênicas na pele de voluntários, características da exposição à radiação UVA (COSMETICS EUROPE, 2006).

Ainda que metodologias *in vivo* permaneçam aprovadas para a avaliação da fotoproteção UVA, seu uso não é recomendado, uma vez que existem metodologias *in vitro* validadas e reguladas para este tipo de determinação, ao contrário do que ocorre para o ensaio do FPS (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011). Ultimamente, o método espectrofotométrico de refletância

difusa, acoplado à esfera de integração, é empregado para a determinação do UVA-PF e do comprimento de onda crítico. O espectrofotômetro utiliza lâmpada de arco de xenônio, com faixa espectral de 250 a 450 nm, capaz de processar os dados de transmitância em cada comprimento de onda e transformá-los em parâmetros de eficácia fotoprotetora. O *design* ótico do equipamento está demonstrado na **Figura 4** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

**Figura 4:** Ilustração do *design* ótico do espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração (adaptado de SPRINGSTEEN *et al.*, 1999)



Além de fornecer parâmetros de eficácia fotoprotetora de forma rápida, econômica e segura (uma vez que poupa os voluntários da exposição às radiações UV empregadas nas análises *in vivo*), os ensaios *in vitro* também apresentam aplicação na pesquisa e desenvolvimento de formulações fotoprotetoras, fornecendo, inclusive, valores estimados de FPS para a triagem e aperfeiçoamento das formulações previamente à sua submissão aos testes clínicos *in vivo* (ANDREASSI, 2011; TANNER, 2006).

Estes e outros fatores fizeram dos métodos *in vitro* um advento na pesquisa em fotoproteção, possibilitando o estudo aprofundado das formulações e, conseqüentemente, dos efeitos deletérios da radiação UV no organismo humano (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

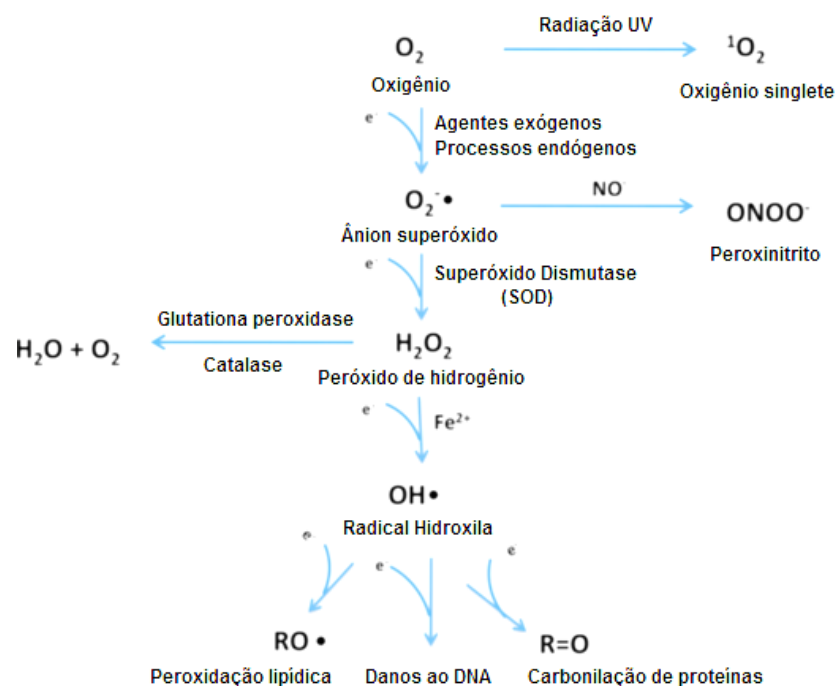
### 2.3. Estresse oxidativo e Atividade antioxidante

O estresse oxidativo, responsável por diversos danos ao organismo, é provocado por radicais livres instáveis produzidos por duas vias principais: o metabolismo mitocondrial (via endógena) e fatores externos como poluentes, pesticidas ou radiação UV (via exógena) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Os principais radicais livres são moléculas sintetizadas a partir de oxigênio, capazes de oxidar compostos ou macromoléculas por meio da doação de elétrons. Caso estes radicais altamente energéticos não sejam neutralizados por substâncias antioxidantes, as reações de oxidação se propagam, afetando estruturas como o DNA celular, proteínas e lipídeos (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo provocado pelos radicais livres, em especial as espécies reativas de oxigênio (EROs), está associado a diversas patologias, tais como o câncer, problemas neurológicos e desordens cardiovasculares (CHEN; HU; WANG, 2012). A **Figura 5** apresenta as principais EROs gerados durante o estresse oxidativo, assim como as suas rotas de síntese e alvos de ação no organismo.

**Figura 5:** Radicais livres e a cadeia de reações envolvida no estresse oxidativo (adaptado de CHEN; HU; WANG, 2012)





O organismo humano apresenta defesas endógenas – enzimáticas e não enzimáticas – responsáveis por combater o estresse oxidativo provocado pelos radicais livres. Dentre as principais enzimas, tem-se a glutathione peroxidase e a catalase, responsáveis pela eliminação de peróxido de hidrogênio; e a superóxido dismutase, responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, para posterior degradação pelo sistema catalase-superóxido dismutase (**Figura 5**) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Dentre as defesas não enzimáticas, citam-se compostos antioxidantes produzidos pelo organismo, como a vitamina A e a coenzima Q10, responsáveis pela neutralização ou prevenção da formação de radicais livres (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A radiação UV é um dos principais fatores exógenos responsáveis pela geração de radicais livres. Enquanto a radiação UVB causa danos diretos ao DNA celular, a radiação UVA causa danos indiretos, envolvendo modificações em bases púricas e pirimídicas por meio da formação de EROs, levando a mutações e neoplasias (CHEN; HU; WANG, 2012).

A radiação UVA reage com cromóforos presentes na pele que, ao absorverem energia, transformam-se em moléculas altamente instáveis; ao retornarem ao estado fundamental, a energia liberada é transferida, na forma de elétrons, para moléculas de oxigênio ( $O_2$ ), iniciando a cascata de oxidação (LIN *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que a exposição à radiação UV por curtos períodos de tempo, de apenas 15 minutos, já são capazes de levar à produção de radicais livres hidroxila e peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, a produção de EROs também pode levar a degradação de antioxidantes endógenos, piorando os danos oxidativos provocados pelos radicais livres (CHEN; HU; WANG, 2012).

Halliwell e Gutteridge (2007) definem antioxidantes como “substâncias capazes de atrasar, prevenir ou remover danos oxidativos ao organismo”. Ainda que a eficiência do sistema antioxidante endógeno seja reconhecida, em condições adversas, incluindo exposição à radiação UV, a complementação com antioxidantes de origem exógena se torna de fundamental importância (CAROCHO; FERREIRA, 2013; CHEN; HU; WANG, 2012).

Os antioxidantes geralmente contêm um grupo doador de elétrons (usualmente um grupamento hidroxila) e podem desativar os radicais livres de acordo com três mecanismos: transferência de átomo de hidrogênio; perda de próton seguida de transferência de elétron; ou transferência de elétron acoplada à transferência de próton (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013). As reações envolvidas em cada mecanismo estão descritas no **Quadro 2**.

**Quadro 2:** Mecanismo de desativação de radicais livres por substâncias antioxidantes (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013)

Mecanismo de desativação	Reações envolvidas
Transferência de Átomo de Hidrogênio	1) $AxOH + R^{\cdot} \rightarrow AxO^{\cdot} + RH$
Perda de próton seguida de transferência de elétron	1) $AxOH \rightarrow AxO^{-} + H^{+}$ 2) $AxO^{-} + H^{+} + R^{\cdot} \rightarrow AxO^{\cdot} + RH$
Transferência de elétron acoplada à transferência de próton	1) $AxOH + R^{\cdot} \rightarrow AxOH^{+\cdot} + R^{-}$ 2) $AxOH^{+\cdot} + R^{-} \rightarrow AxO^{\cdot} + RH$

**Legenda:** AxOH: composto antioxidante;  $R^{\cdot}$  = radical livre;  $AxO^{\cdot}$  = radical livre formado a partir do antioxidante; RH = radical livre estabilizado;  $H^{+}$ : próton.

Atualmente, antioxidantes sintéticos – com ênfase para as moléculas BHA e BHT – têm sido amplamente utilizados na prevenção da oxidação de alimentos, cosméticos e medicamentos. Porém, devido a estudos indicando possíveis efeitos deletérios destes tipos de composto, há grande interesse no potencial antioxidante de compostos naturais (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Dentre os grupos de compostos bioativos atualmente estudados, destaque deve ser dado aos polifenóis, classe que também abrange os flavonoides e outros subgrupos, como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008). Estudos comprovaram a eficácia destes compostos naturais não apenas na prevenção do estresse oxidativo, mas, também, na terapêutica do câncer e de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ULLAH; KHAN, 2008).

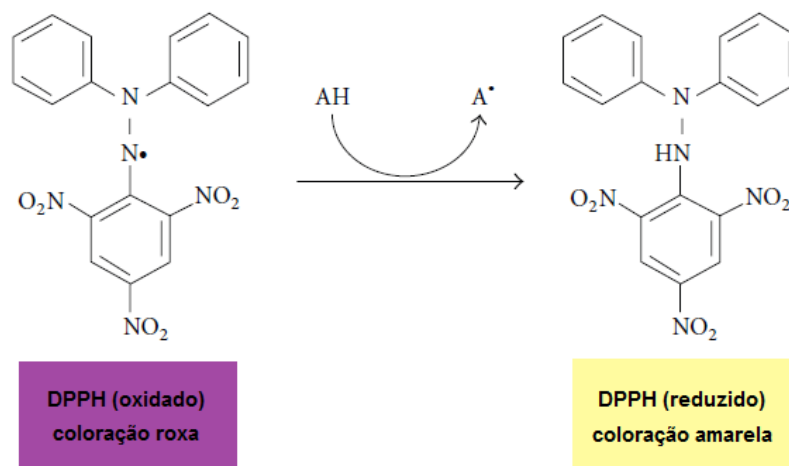
### 2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante

Existem métodos diversos para a avaliação da atividade antioxidante de substâncias sintéticas e naturais, cada um com seu respectivo mecanismo de ação, vantagens e desvantagens. Para a seleção do método antioxidante ideal, alguns fatores devem ser avaliados, como a função do antioxidante na formulação (inibir radicais livres, por exemplo); a localização do antioxidante no sistema em avaliação (fase aquosa ou oleosa); e os possíveis interferentes (substâncias da formulação com absorção próxima ao comprimento de onda de análise, por exemplo). Avaliando-se estes pontos, é possível selecionar a metodologia adequada e, conseqüentemente, obter resultados robustos e diretamente relacionados com o potencial antioxidante dos compostos no organismo (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Um dos métodos para avaliação da atividade antioxidante mais utilizados emprega o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), capaz de mudar de coloração quando reduzido por substâncias antioxidantes (transferência de átomo de hidrogênio). Ao ser reduzido, o composto passa de roxo a amarelo, levando à queda dos valores de absorbância, monitorados espectrofotometricamente (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

A **Figura 6** representa a reação envolvida na redução da molécula de DPPH por substâncias antioxidantes.

**Figura 6:** Redução da molécula de DPPH por substâncias antioxidantes  
(adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2013)



Considerando que a radiação UV é uma das principais causas dos danos oxidativos cutâneos, a busca por técnicas analíticas para a avaliação da atividade antioxidante da pele, assim como de sistemas antioxidantes aplicados topicamente, se torna de fundamental importância. Com este foco, a utilização da técnica de *tape stripping* para a obtenção e estudo do estrato córneo se apresenta como metodologia promissora (ALONSO *et al.*, 2009).

O estrato córneo representa a parte mais externa e a principal barreira da pele, sendo formado por 15 a 20 camadas de células mortas denominadas corneócitos, inseridos em uma matriz lipídica organizada em bicamadas. Dependendo das propriedades das substâncias aplicadas topicamente, serão observados dois efeitos: moléculas lipofílicas tendem a se acumular no estrato córneo, enquanto moléculas hidrofílicas tendem a permanecer na superfície da pele. Ainda, a massa molar dos compostos e a quantidade aplicada também impactam a penetração (FÖRSTER *et al.*, 2009).

A técnica de *tape stripping*, passível de ser aplicada em voluntários, se caracteriza pela remoção do estrato córneo, empregando-se a aplicação sucessiva e repetida de fitas adesivas em uma mesma área da pele, com posterior quantificação dos compostos de interesse retidos. Sabendo-se que substâncias de uso tópico atingem a epiderme e a derme após a sua distribuição pelo estrato córneo, é possível correlacionar a concentração da substância retida na camada córnea com a capacidade de penetração dos compostos (LADEMANN *et al.*, 2009; SHAH; GLYNN; YACOBI, 1998). De forma geral, assume-se que a aplicação de 20 fitas adesivas é suficiente para a remoção de, até, 90% do estrato córneo: as primeiras fitas são capazes de remover uma camada quase completa de corneócitos, que diminui continuamente com o aumento do número de fitas empregadas (BENFELDT *et al.*, 2007).

Experimentos de *tape stripping* são vantajosos pela sua facilidade de execução e desconforto mínimo aos voluntários, porém, alguns parâmetros podem influenciar a quantidade de estrato córneo removido pela fita adesiva e, quando possível, devem ser padronizados. Como fatores intrínsecos, citam-se diferenças inter-individuais, como o grau de hidratação cutânea, a coesão entre os corneócitos e a região anatômica de remoção. Já como fatores extrínsecos, citam-se a duração e pressão com que a fita é aplicada na pele, a velocidade de remoção e o tipo de fita empregada (LADEMANN *et al.*, 2009).

Por se tratar de uma técnica minimamente invasiva, o *tape stripping* vem sendo constantemente utilizado para avaliar o perfil de retenção e distribuição de substâncias diversas na pele; no entanto, campo de pesquisa pouco explorado é a combinação da técnica de *tape stripping* com metodologias analíticas para avaliação da atividade antioxidante da pele e de sistemas antioxidantes aplicados topicamente (DARLENSKI *et al.*, 2009).

Em estudo inovador, Alonso e colaboradores (2009) combinaram a técnica de *tape stripping* com um método *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante do estrato córneo, visando determinar a eficácia de formulações de uso tópico contendo antioxidantes. Os resultados indicaram que os antioxidantes tópicos reduziram os índices de peroxidação lipídica da pele após exposição à radiação UV, promovendo proteção cutânea contra os danos oxidativos. Adicionalmente, o estudo apresentou a vantagem de não expor os participantes diretamente à radiação UV, visto que apenas o estrato córneo, após remoção por *tape stripping*, foi irradiado.

Isto posto, ainda que a técnica de *tape stripping* apresente limitações, a sua simplicidade e possibilidade de combinação com métodos *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante representam um advento na determinação dos danos cutâneos causados pela radiação UV, permitindo explorar, de forma segura para os participantes dos estudos, o potencial de sistemas antioxidantes na efetiva proteção da pele contra o estresse oxidativo.

#### **2.4. Protetores solares multifuncionais**

Os protetores solares tradicionais, embora difundidos como a principal forma de proteção contra a radiação UV, não são completamente adequados como fonte única de prevenção contra o estresse oxidativo causado pelos radicais livres (ZHANG *et al.*, 2010). Haywood e colaboradores (2003) demonstraram, por espectroscopia do *spin* eletrônico de excisados de pele obtidos por cirurgia plástica, que protetores solares, ainda que apresentassem amplo espectro de proteção, reduziram a formação de radicais livres em apenas 55%, após exposição dos estratos de pele à radiação UV artificial.

Como forma de prevenção do estresse oxidativo provocado pela radiação UV, pesquisas recentes recomendam o tratamento com antioxidantes,

obtidos, primordialmente, pela ingestão de alimentos funcionais. No entanto, grande parte das moléculas é degradada pela via de administração oral, devido a mecanismos de primeira passagem, fator que reduz os níveis de antioxidantes no organismo – em especial na pele, principal órgão afetado pela radiação (ZHANG *et al.*, 2010).

Visando aumentar a concentração dos antioxidantes na pele e evitar a sua degradação, pesquisas propuseram a via de administração tópica, capaz de aumentar o tempo de meia-vida das moléculas e, concomitantemente, proteger a pele mais efetivamente contra os malefícios da radiação UV (CHEN; HU; WANG, 2012). Dentre os antioxidantes já avaliados para aplicação tópica, destaque pode ser dado às vitaminas e compostos fenólicos, capazes de proteger a pele contra o estresse oxidativo, fotoenvelhecimento, eritema e peroxidação lipídica de membranas celulares (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

Considerando as vantagens apresentadas, a combinação de antioxidantes com filtros solares se apresenta como opção promissora, uma vez que os compostos presentes agiriam de forma sinérgica, por mecanismos diferentes e complementares (formulações multifuncionais): enquanto os filtros atuariam na superfície da pele, absorvendo ou refletindo a radiação UV, os antioxidantes poderiam atuar tanto na superfície (absorvendo radiação UV) quanto em camadas mais profundas da derme e epiderme (combatendo o estresse oxidativo), fornecendo, portanto, proteção solar de excelência (LIN *et al.*, 2005).

Como estratégia para atender os benefícios expostos, os antioxidantes incorporados à formulações de uso tópico devem contemplar alguns requisitos: **(i)** eficácia na remoção de radicais livres; **(ii)** ao interagir com radicais livres, devem originar radicais estabilizados, incapazes de propagar as reações do estresse oxidativo; **(iii)** apresentar certa permeação cutânea, mantendo níveis adequados tanto na superfície da pele, quanto na epiderme e derme; **(iv)** apresentar aspecto adequado, uma vez que a coloração de determinados compostos pode ser um impeditivo farmacotécnico (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

Em suma, a associação de antioxidantes e filtros solares agregaria valor aos fotoprotetores tradicionais, favorecendo novas pesquisas orientadas na determinação dos melhores compostos antioxidantes para o desenvolvimento de formulações multifuncionais (CHEN; HU; WANG, 2012).

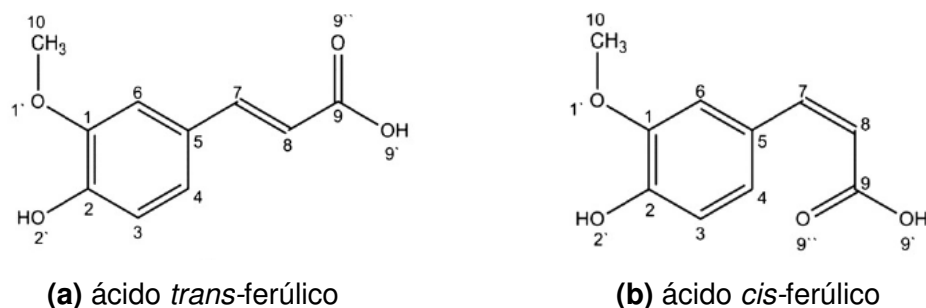
## 2.5. Ácido ferúlico

O ácido ferúlico é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, extraído pela primeira vez em 1866 a partir da planta *Ferula foetida*, responsável pela sua denominação (GRAF, 1992). O ácido ferúlico é gerado a partir do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, podendo ser encontrado nas mais diversas fontes naturais, tais como: milho, arroz, trigo, beterraba, alcachofra, café e frutas vermelhas, seja em sua forma livre, ou conjugado a proteínas e polissacarídeos da parede celular (PAIVA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A obtenção do ácido ferúlico para uso industrial ocorre por duas vias principais: extraído de fontes naturais por hidrólise ou ação enzimática de micro-organismos; ou sinteticamente, pela reação de condensação da vanilina com o ácido malônico, catalisada por amins terciárias (GRAF, 1992; OU; KWOK, 2004).

Com relação a sua molécula, o ácido ferúlico apresenta isomeria *cis-trans*, sendo a forma *trans* a mais comumente encontrada na natureza. O ácido *cis* se apresenta como um óleo amarelado, com absorção UV máxima de 316 nm, enquanto o ácido *trans* tem formato de cristais com dois picos máximos de absorção, a saber: 284 e 307 nm (GRAF, 1992). A estrutura química dos isômeros *cis* e *trans* do ácido ferúlico podem ser observadas na **Figura 7**.

**Figura 7:** Estrutura química dos isômeros *cis* e *trans* do ácido ferúlico (adaptado de URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013)



O ácido ferúlico, tanto em sua forma *cis* quanto em sua forma *trans*, apresenta resultados comprovados na terapêutica de diversas patologias, como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas e cardíacas, além de

ações antimicrobiana, anti-inflamatória e, principalmente, atividade antioxidante, responsável pelos seus principais benefícios e aplicações (SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007). Acredita-se que a atividade antioxidante do ácido ferúlico esteja relacionada à sua capacidade de interrupção da cadeia de radicais livres; porém, outros mecanismos já foram avaliados, como a capacidade quelante de metais – reconhecidos catalisadores do estresse oxidativo – e a inibição de enzimas envolvidas na produção de EROs (OU; KWOK, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A ação antioxidante do ácido ferúlico é devida, em especial, à sua capacidade de neutralizar três tipos de radicais livres: peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila, reduzindo a degradação de proteínas e lipídeos – provocadas, em especial, pelo radical hidroxila. Adicionalmente, o ácido ferúlico também se mostrou efetivo na regulação e restauração de enzimas envolvidas no combate ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

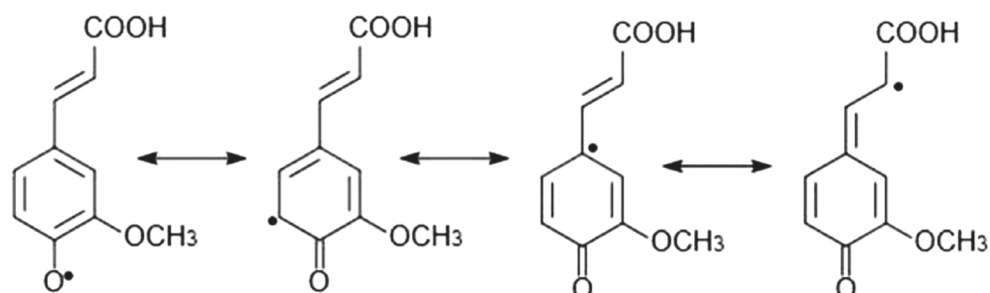
De acordo com Graf (1992), a atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos é fortemente relacionada às propriedades estruturais de suas moléculas. Em relação ao ácido ferúlico, quatro características respondem pela sua ação antioxidante: (i) grupamento hidroxila, doador de elétrons, ligado ao anel benzênico e responsável por neutralizar as EROs; (ii) cadeia vinílica lateral, que conecta o grupamento carboxila ao anel benzênico e aumenta a estabilização da molécula por fenômeno de ressonância, além de fornecer um local de ataque adicional aos radicais livres; (iii) substituinte metoxila, capaz de formar uma ligação de hidrogênio com o grupamento hidroxila e fornecer estabilização adicional à molécula; e (iv) propriedade de ancoragem do grupamento carboxílico às membranas celulares, promovendo proteção contra a peroxidação lipídica (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2013; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Durante a reação entre o ácido ferúlico e os radicais livres, o átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila é transferido ao radical livre, estabilizando-o; concomitantemente, é formado um radical fenoxila proveniente da molécula do ácido ferúlico, altamente estabilizado por ressonância, já que o elétron desemparelhado se encontra delocalizado por toda a molécula, e não apenas no átomo de oxigênio. Devido à esta estabilização, o radical fenoxila apresenta



reatividade baixa, não sendo capaz de iniciar ou propagar as reações da cadeia oxidativa, encerrando o processo ao se condensar com outro radical fenoxila, com a formação de produtos fenólicos também com ação antioxidante (GRAF, 1992). O mecanismo de ressonância do radical fenoxila, formado a partir da molécula de ácido ferúlico, encontra-se na **Figura 8**.

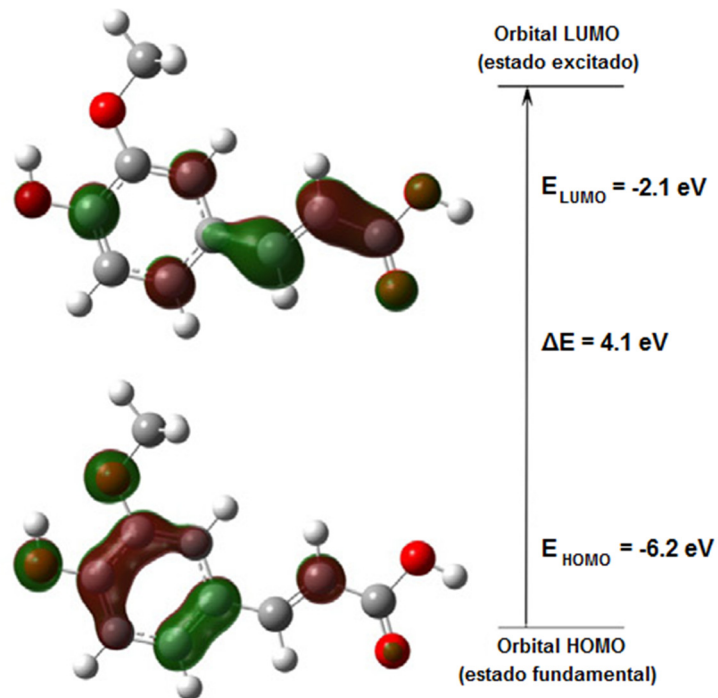
**Figura 8:** Mecanismo de ressonância e de estabilização do radical fenoxila proveniente do ácido ferúlico (PAIVA *et al.*, 2013)



Razzaghi-Asl e colaboradores (2013) comprovaram o mecanismo de ressonância e estabilização do ácido ferúlico por meio do estudo dos orbitais moleculares HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) do composto bioativo.

Na molécula de ácido ferúlico, representada na **Figura 9**, a densidade eletrônica do orbital HOMO se concentrou no anel aromático e nos átomos de oxigênio dos grupamentos doadores de elétrons (hidroxila e metoxila), regiões com maior atividade antioxidante na molécula. Já a densidade eletrônica do orbital LUMO se localizou no anel benzênico, na cadeia vinílica e no grupamento carboxílico, demonstrando a delocalização eletrônica responsável pela estabilização da molécula quando em seu estado excitado (radical fenoxila) (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013). A **Figura 9** ilustra o mapa de distribuição eletrônica do ácido ferúlico, com representação dos orbitais HOMO e LUMO.

**Figura 9:** Mapa de distribuição eletrônica do ácido ferúlico, representando os orbitais HOMO e LUMO (adaptado de URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013)



É sabido que o pKa dos compostos e o valor de pH do meio determinam a razão entre os estados ionizado e não ionizado das substâncias químicas, sendo que substâncias não ionizadas, por serem mais lipofílicas, apresentam maior capacidade de permeação cutânea. Desta forma, uma importante característica para o ácido ferúlico é o valor de pH do meio no qual a molécula se encontra, com influência não apenas em sua permeação cutânea, mas também em sua atividade antioxidante, visto que a ionização pode levar a perda de sítios de ataque para as EROs (MONTI *et al.*, 2011).

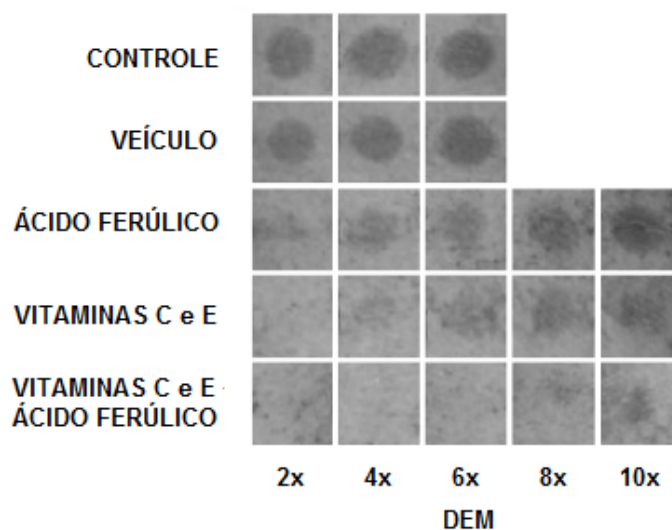
O ácido ferúlico apresenta dois valores de pKa: 4,56 (referente a ionização do grupamento carboxílico) e 8,65 (referente à ionização do grupamento hidroxila). Logo, em valores de pH levemente ácidos (5,5 a 6,5), comumente empregados em formulações cosméticas, a molécula apresenta o grupamento hidroxila (principal região de atividade antioxidante) preservado em sua forma não ionizada e, portanto, disponível para a neutralização de EROs (ERDEMGIL *et al.*, 2007; MONTI *et al.*, 2011).

Em vista de sua atividade antioxidante pronunciada e seu número elevado de insaturações conjugadas (característicos de absorvância na faixa

do UV), o ácido ferúlico é aprovado em diversos países, como o Japão, onde pode ser utilizado como aditivo em alimentos e ingrediente ativo em formulações cosméticas e farmacêuticas (GRAF, 1992).

Considerando a sua aplicação tópica em voluntários, estudos diversos demonstraram a eficácia do ácido ferúlico contra os malefícios da radiação UV. Em três estudos semelhantes, foram avaliados os efeitos da incorporação do ácido ferúlico a soluções tópicas contendo vitaminas. O composto bioativo, além de aumentar a estabilidade química das vitaminas, também proporcionou aumento de sua eficácia fotoprotetora contra a radiação UV, reduzindo os níveis de eritema e de apoptose dos corneócitos (LIN *et al.*, 2005; ORESAJO *et al.*, 2008; SAIJA *et al.*, 2000). A **Figura 10** apresenta os resultados obtidos em um dos estudos, evidenciando a redução de eritema proporcionada pelo ácido ferúlico.

**Figura 10:** Prevenção da formação de eritema devido à aplicação tópica de vitaminas e ácido ferúlico (adaptado de LIN *et al.*, 2005)



Em outro estudo, conduzido por Staniforth e colaboradores (2012), o tratamento tópico de cobaias com ácido ferúlico reduziu a degradação das fibras de colágeno e preveniu a hiperplasia da epiderme, ambas induzidas após exposição à radiação UVB. Estes resultados indicaram que o ácido ferúlico previne os efeitos deletérios da radiação UVB em todas as camadas da pele, reduzindo fenômenos distintos, como a formação de eritemas (característico da epiderme) e o fotoenvelhecimento (derme).

Considerando a segurança do ácido ferúlico, Zhang e colaboradores (2010) avaliaram fatores macroscópicos de dano cutâneo após a aplicação tópica de ácido ferúlico, como a perda de água transepidérmica, a formação de eritema e o valor de pH da pele. Os resultados indicaram que o composto bioativo não causou irritação cutânea, evidenciando que a administração tópica, além de eficiente, é também segura para o tratamento com o ácido ferúlico.

Pelo exposto, a associação de ácido ferúlico a formulações cosméticas representa linha de pesquisa potencial: o composto bioativo pode ser associado a hidratantes anti-idade, por conta de sua proteção contra a degradação de colágeno da derme, ou à maquiagens e tinturas capilares, que necessitam de eficiente proteção e manutenção da cor (STANIFORTH *et al.*, 2012). No entanto, considerando seu principal mecanismo de ação (atividade antioxidante), investigação de potencial é a associação do ácido ferúlico a filtros solares em formulações fotoprotetoras multifuncionais, onde o composto, além de atuar pelos seus mecanismos antioxidantes e fotoprotetores, também poderia proporcionar estabilidade aos filtros solares, inibindo a fotodegradação ao atuar como “substrato de sacrifício” (LIN *et al.*, 2005).

Por fim, considerando-se a eficácia e segurança da molécula, o ácido ferúlico se apresenta como candidato promissor para aplicação em formulações fotoprotetoras multifuncionais, podendo proporcionar níveis de proteção de excelência contra os malefícios provocados pela radiação UV, adicionados à multifuncionalidade das preparações.

*Objetivos*

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O projeto contemplou o desenvolvimento e a avaliação de sistemas fotoprotetores multifuncionais compostos pelos filtros solares **bemotrizinol** e **octil triazona**, acrescidos do composto bioativo **ácido ferúlico**. O caráter de multifuncionalidade das formulações foi evidenciado por meio das suas propriedades fotoprotetoras contra as radiações UVA e UVB, bem como pelas características antioxidante e redutora de eritema do ácido ferúlico (SAIJA *et al.*, 2000; SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

#### 3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos estão descritos a seguir:

- Desenvolvimento de formulações fotoprotetoras multifuncionais, por meio de delineamento experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*), contendo os compostos ativos e bioativo.
- Determinação das características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras.
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das formulações e do composto bioativo isolado.
- Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS estimado, comprimento de onda crítico e fotoestabilidade) das formulações, por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.
- Avaliação da estabilidade das formulações de melhor desempenho, por meio da determinação das suas características organolépticas e funcionais *in vitro*.

- Avaliação da segurança *in vivo* das preparações de melhor desempenho, por meio dos ensaios clínicos de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica.
  
- Determinação do potencial antioxidante da epiderme (inibição da formação de radicais livres), após tratamento com as preparações de melhor desempenho, por meio de ensaio *ex vivo* (*tape stripping*).
  
- Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vivo* das preparações de melhor desempenho, por meio da determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção UVA (UVA-PF).

# *Material e Métodos*

---



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Os equipamentos (aparatos e dispositivos, entre outros) empregados na presente pesquisa estão descritos no **Quadro 3**.

**Quadro 3:** Equipamentos e afins utilizados nesta pesquisa

Equipamentos	Marcas e modelos
Agitador mecânico	IKA® RW 20n
Balança analítica	Shimadzu® AUY 220
Balanças semi-analíticas	Gehaka® BG 4000 e Ohaus® ARD 110
Banho termostatzado	Nova Ética® N480
Banho de ultrassom	Unique® UltraCleaner 1600A
Câmara de fotoestabilidade	Atlas Suntest® CPS+
Centrífuga	Hitachi® RX2
Desumidificador	Arsec® 360
Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração	Labsphere® UV 2000S
Espectrofotômetro UV-Visível	Thermo Scientific® Evolution 600
Fitas adesivas para <i>Tape Stripping</i>	3M® Scotch Magic™ Tape
Micropipetas monocal	Eppendorf® 100-1000 µL e 1,0-10,0 mL
Microscópio Digital	DinoLite® Basic AM2111
Placa de aquecimento	IKA® HS7
Placas de polimetilmetacrilato (PMMA)	HelioScreen® Helioplate HD 6
Refrigerador	Consul® Frost Free 60
Simulador Solar UVA	ProLumina® Mini
Simulador Solar UVB	Solar Light Co. Inc. Multiport® 601
Sistema purificador de água	Merck Millipore® Mili-Q® Simplicity UV
Peagômetro	Quimis® Q400 AS
Termo-higrômetro	Hygro-meter®
Termômetro digital	JProlab®
Viscosímetro rotativo	Fungilab® ViscoStar R

As matérias-primas utilizadas estão descritas no **Quadro 4** e apresentaram grau de pureza cosmético ou farmacêutico.

**Quadro 4:** Matérias-primas utilizadas nesta pesquisa

<b>Matéria-prima (nome comercial)</b>	<b>Nomenclatura INCI</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>Ácido ferúlico</b>	<i>Ferulic acid</i>	Henrifarma®
<b>Bemotrizinol</b>	<i>Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine</i>	Brasquim®
<b>C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> benzoato de alquila</b>	<i>C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> alkyl benzoate</i>	Brasquim®
<b>Cocoato de butilenoglicol</b>	<i>Butilenoglicol cocoate</i>	Brasquim®
<b>EDTA dissódico</b>	<i>Disodium EDTA</i>	PharmaSpecial®
<b>Crospolímero de dimeticona</b>	<i>Cyclomethicone (and) dimethicone crosspolymer</i>	Fagron®
<b>Glicerina</b>	<i>Glycerin</i>	Fagron®
<b>Miristato de isopropila</b>	<i>Isopropyl miristate</i>	PharmaSpecial®
<b>Octil triazona</b>	<i>Ethylhexyl triazone</i>	D'Altomate®
<b>Pemulen® TR2</b>	<i>Acrylates / C<sub>10-30</sub> Alkyl Acrylate Crosspolymer</i>	Fagron®
<b>Phenonip®</b>	<i>Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) propylparaben (and) butylparaben</i>	PharmaSpecial®
<b>Ciclopentassiloxano</b>	<i>Cyclomethicone</i>	PharmaSpecial®
<b>Simulgel® INS 100</b>	<i>Hydroxyethyl acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer (and) isohexadecane (and) polysorbate 60</i>	Seppic®
<b>Trietanolamina</b>	<i>Triethanolamine</i>	Volp®

**Legenda:** Nomenclatura conforme INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*).

Os reagentes e solventes empregados durante as análises estão descritos no **Quadro 5** e apresentaram grau de pureza analítico.

**Quadro 5:** Reagentes e solventes empregados

<b>Material (nome químico ou comercial)</b>	<b>Nomenclatura INCI</b>	<b>Fornecedor</b>
<b>BHT</b>	<i>BHT</i>	Vital Especialidades®
<b>DPPH</b>	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>	Sigma Aldrich®
<b>Metanol</b>	<i>Methyl alcohol</i>	Merck®

**Legenda:** Nomenclatura conforme INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*).

#### 4.2. Atividade antioxidante do ácido ferúlico isolado

O potencial antioxidante do ácido ferúlico foi determinado por meio da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações (SHARMA; BHAT, 2009).

Alíquotas de 0,1 mL de soluções metanólicas contendo o composto bioativo, em diferentes concentrações, foram transferidas para tubos de centrífuga, com adição de 3,9 mL de solução metanólica de DPPH• a 70,0 µM. Os tubos foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C) e ao abrigo de luz. Após 60 minutos de reação, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Como controles negativo e positivo, foram utilizados, respectivamente, metanol e solução metanólica (1,0% p/p) de butil hidroxi tolueno (BHT), o último com reconhecida atividade antioxidante.

A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de redução do DPPH• pelas amostras, de acordo com a **Equação 1**.

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

**Equação 1:** Cálculo da porcentagem de redução do radical livre DPPH. Na qual:

*Abs controle* = absorvância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol);

*Abs amostra* = absorvância da solução de DPPH• preparada com a amostra em teste.

### 4.3. Desenvolvimento das formulações multifuncionais

Foram preparados sistemas emulsionados do tipo óleo em água (O/A), contendo o filtro solar UVB octil triazona e o filtro solar de amplo espectro bemotrizinol, acrescidos do composto bioativo ácido ferúlico. A combinação de compostos, inovadora e inédita no mercado cosmético, foi selecionada com base na aplicação dos filtros solares utilizados, bem como nas características multifuncionais do composto bioativo, que apresenta propriedades antioxidantes e de absorção da radiação UVB (SAIJA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2010).

Os filtros solares, em suas máximas concentrações permitidas pela legislação vigente (5,0% p/p de octil triazona e 10,0% p/p de bemotrizinol), foram combinados com 1,0% p/p do composto bioativo por meio de um delineamento experimental do tipo fatorial *DoE 2<sup>3</sup>*, com três fatores em dois níveis, conforme exposto na **Tabela 1**. As formulações foram preparadas em triplicata e de forma randomizada, visando reduzir possíveis fontes de erro que pudessem influenciar os resultados obtidos (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; BRASIL, 2006).

**Tabela 1:** Delineamento experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*) aplicado no desenvolvimento das formulações fotoprotetoras

Formulações	Proporção (% p/p)		
	Octil triazona	Bemotrizinol	Ácido ferúlico
F1	-	-	-
F2	-	-	1,0
F3	5,0	-	-
F4	5,0	-	1,0
F5	-	10,0	-
F6	-	10,0	1,0
F7	5,0	10,0	-
F8	5,0	10,0	1,0

**Legenda:** (-) = composto não adicionado

A **Tabela 2** apresenta as matérias-primas empregadas no preparo em escala laboratorial das formulações do presente estudo, assim como suas concentrações e classe cosmética. Ademais dos compostos ativos e bioativo, foram selecionados componentes diversos, responsáveis, entre outros, pela

estabilidade e aperfeiçoamento das características sensoriais das preparações, garantindo seu uso contínuo e de forma adequada pelos consumidores (JANSEN *et al.*, 2013a).

**Tabela 2:** Composição qualitativa e quantitativa (% p/p) das formulações fotoprotetoras multifuncionais (F1 a F8)

	Composição (nome químico ou comercial)	Função (BRANDÃO, 2009)	Proporção (% p/p)							
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Fase Oleosa	Octil triazona	Filtro solar UVB	-	-	5,00	5,00	-	-	5,00	5,00
	Bemotrizinol	Filtro solar de amplo espectro	-	-	-	-	10,00	10,00	10,00	10,00
	C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> benzoato de alquila	Emoliente e condicionante	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
	Cocoato de butilnoglícol	Emoliente e estabilizante	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
	Miristato de isopropila	Emoliente	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
	Ciclopentassiloxano	Emoliente (formador de filme)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
	Crospolímero de dimeticona	Espessante (formador de filme)	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
	Simulgel <sup>®</sup> INS 100	Base autoemulsionante	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Fase Aquosa	Glicerina	Umectante e hidratante	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
	Phenonip <sup>®</sup>	Sistema conservante	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
	EDTA dissódico	Sequestrante	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
	Pemulen <sup>®</sup> TR2	Co-emulsificante e Doador de Consistência	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	Ácido ferúlico	Antioxidante (composto bioativo)	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00
	Água purificada	Veículo	64,35	63,35	59,35	58,35	54,35	53,35	49,35	48,35
	Trietanolamina	Corretor do valor de pH	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

**Legenda:** q.s.: quantidade suficiente; (-) : matéria-prima não adicionada. Nomenclatura INCI dos compostos foi descrita no Quadro 5.

O modo de preparo das formulações está descrito a seguir:

***Fase Oleosa:***

A) *Solubilização dos filtros solares:* Em béquer, os filtros solares foram solubilizados nos emolientes, sob aquecimento a 80 °C. Após a solubilização, permitiu-se o resfriamento da mistura, à temperatura ambiente.

B) *Preparo da mistura de silicones:* Em béquer, o crosopolímero de dimeticona foi disperso no ciclopentassiloxano, com agitação manual com auxílio de bastão de vidro, até a obtenção de mistura homogênea.

C) *Preparo da Fase Oleosa final:* A base autoemulsionante e a mistura de silicones foram adicionadas ao béquer contendo os filtros solares solubilizados, com agitação manual para a completa homogeneização.

***Fase Aquosa:***

A) *Preparo da solução de ácido ferúlico:* Em béquer, foram adicionados o ácido ferúlico e a água purificada, com posterior adição de trietanolamina para ajuste de valor de pH ( $6,5 \pm 0,5$ ) e solubilização parcial do composto bioativo. Para as formulações ausentes do ácido ferúlico, adicionou-se ao béquer apenas a água purificada, com posterior ajuste do valor de pH ( $6,5 \pm 0,5$ ).

B) *Preparo da Fase Aquosa final:* Ao béquer contendo a solução de ácido ferúlico, foram adicionados os demais componentes da Fase Aquosa, sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) com velocidade de 1500 rpm. A agitação foi mantida até a completa hidratação do polímero Pemulen® TR2. Ao final da mistura, o valor de pH do sistema foi novamente ajustado ( $6,5 \pm 0,5$ ).

***Processo de emulsificação a frio:***

A emulsão foi preparada vertendo-se rapidamente a **Fase Aquosa** sob a **Fase Oleosa**, sob agitação mecânica (hélice modelo *dissolver*) com velocidade de 1500 rpm. Após a formação da emulsão, a agitação foi mantida por três minutos.

#### **4.3.1. Estabilidade Preliminar das formulações**

Após o desenvolvimento, as formulações fotoprotetoras foram submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar (EEP), responsável por evidenciar aceleradamente possíveis sinais de instabilidade. O estudo envolveu os ensaios de Centrifugação e Estresse Térmico, realizados após 24 horas do preparo das formulações, a fim de se completar o processo de emulsificação (BRASIL, 2004).

No teste da centrifugação, foram pesados cerca de 5,0 g de cada formulação em tubos de centrífuga. O teste foi conduzido de acordo com as seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C); velocidade de rotação de 3.000 rpm; e tempo de teste de 30 minutos (BRASIL, 2004).

No teste do estresse térmico, cerca de 5,0 g de cada formulação foram pesados em tubos de ensaio e submetidos a banho termostatizado, elevando-se gradativa e controladamente o valor inicial de temperatura. O ensaio foi conduzido a partir de 40 °C (temperatura inicial) até 80 °C (temperatura final), elevando-se a temperatura em 10 °C a cada 30 minutos (BRASIL, 2004).

Após repouso de 60 minutos e arrefecimento à temperatura ambiente, as formulações foram avaliadas quanto a possíveis alterações visuais – como separação de fases, coalescência ou presença de precipitados – e classificadas como normais (N) ou modificadas (M). As preparações foram consideradas aprovadas em caso de obtenção de conceito normal (N) em ambos os testes (BRASIL, 2004).

#### **4.4. Caracterização física e físico-química das formulações**

As amostras aprovadas no EEP foram caracterizadas por meio de testes físicos (viscosidade aparente) e físico-químicos (valor de pH). As propriedades organolépticas foram determinadas por meio do aspecto, cor e odor das formulações (BRASIL, 2004).

A determinação do valor de pH foi realizada em peagômetro com eletrodo de imersão direta, específico para a análise de semissólidos (SARRUF *et al.*, 2013). Para a determinação da viscosidade aparente, cerca de 15,0 g de formulação foram transferidos para o compartimento de análise do viscosímetro rotativo. A aferição da viscosidade aparente, em centiPoise (cP), foi efetuada



em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C) e após três minutos de agitação, utilizando-se agulha do tipo TR11 e velocidade de agitação de 30 rpm.

As preparações foram avaliadas quanto à obtenção de emulsões macroscopicamente estáveis e com valor de pH biocompatível com a epiderme, além de características organolépticas e viscosidade aparente adequados, segundo critérios do formulador/mercado e outros referendados pela literatura.

#### **4.5. Análise do delineamento experimental do tipo fatorial (DoE 2<sup>3</sup>)**

Na presente pesquisa, avaliou-se, por meio do delineamento experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*), o impacto do composto bioativo ácido ferúlico, assim como sua interação com os filtros solares octil triazona e bemotrizinol, na eficácia funcional das formulações fotoprotetoras (**F1 a F8**). Os parâmetros avaliados pelo delineamento experimental foram os seguintes: **(i)** atividade antioxidante *in vitro* das formulações; **(ii)** porcentagem de transmitância *in vitro* da radiação UVB; e **(iii)** porcentagem de transmitância *in vitro* da radiação UVA.

A significância estatística dos fatores, e suas interações, para cada um dos parâmetros avaliados foi mensurado por meio de gráficos de efeitos principais para cada variável isolada; gráficos de causa e efeito (Pareto) para as variáveis isoladas e suas combinações; e gráficos de contorno para otimização dos modelos estatísticos obtidos. Após a análise dos resultados, foi possível determinar as equações de regressão e adequabilidade dos modelos propostos (valor de  $R^2$ ) para cada parâmetro em análise (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

#### **4.6. Caracterização funcional *in vitro* das formulações**

##### **4.6.1. Atividade antioxidante**

O potencial antioxidante das formulações foi determinado por meio da redução do radical livre DPPH•. Alíquotas de 0,1 g dos fotoprotetores foram tratadas seguindo as mesmas condições analíticas empregadas nas análises de atividade antioxidante do ácido ferúlico isolado (*item 4.2.*).

A atividade antioxidante foi expressa por meio da porcentagem de redução do DPPH• pelas formulações, de acordo com a **Equação 2**.

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs formulação}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

**Equação 2:** Cálculo da porcentagem de redução do radical livre DPPH. Na qual:

*Abs controle* = absorbância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol);

*Abs formulação* = absorbância da solução de DPPH• preparada com a formulação em teste.

#### 4.6.2. Eficácia fotoprotetora

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. Para o ensaio, alíquotas das formulações foram pesadas e aplicadas uniformemente, sob a forma de filme de 1,3 mg/cm<sup>2</sup>, sobre a superfície de placas de polimetilmetacrilato (PMMA) de 25 cm<sup>2</sup>, substrato internacionalmente empregado por mimetizar as características de rugosidade da superfície da pele humana (COSMETICS EUROPE, 2011; UNITED STATES, 2011).

Após secagem de 30 minutos, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica, utilizando uma placa de PMMA sem produto como branco de leitura. Foram empregadas, no mínimo, cinco leituras de transmitância por placa avaliada.

Os resultados de transmitância das amostras foram tratados pelo programa UV-2000®, em intervalo de comprimento de onda de 290 a 400 nm e taxa de progressão de 1,0 nm. Os dados foram convertidos em valores estimados de fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico ( $\lambda$  crit) das formulações. (COSMETICS EUROPE, 2011; DIFFEY *et al.*, 2000; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

O FPS estimado *in vitro* foi obtido por meio da **Equação 3** (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda T\lambda d\lambda}$$

**Equação 3:** Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS estimado). Na qual:

$E\lambda$  = eficácia eritematógena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*);

$S\lambda$  = irradiância solar espectral;

$T\lambda$  = transmitância espectral da amostra;

$d\lambda$  = intervalo dos comprimentos de onda.

O comprimento de onda crítico estimado das amostras foi determinado pela **Equação 4** (UNITED STATES, 2011).

$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda)d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d\lambda$$

**Equação 4:** Comprimento de onda crítico *in vitro*. Na qual:

$A(\lambda)$  = absorvância espectral da amostra;

$d(\lambda)$  = intervalo dos comprimentos de onda.

#### 4.6.3. Fotoestabilidade

Conforme legislação das principais agências regulatórias, dentre elas o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a irradiação prévia das amostras configura etapa obrigatória para a correta avaliação e determinação da fotoestabilidade de formulações fotoprotetoras. A etapa de irradiação permite avaliar alterações no potencial fotoprotetor decorrentes da degradação dos filtros solares pela radiação ultravioleta artificial emitida pela câmara de fotoestabilidade (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

O ensaio utilizou as mesmas condições analíticas e substratos empregados nas análises de atividade antioxidante *in vitro* (item 4.6.1.) e eficácia fotoprotetora estimada (item 4.6.2.), com a etapa adicional de irradiação das formulações em câmara de fotoestabilidade equipada com lâmpada de xenônio (1500 W) e filtro de vidro responsável por mimetizar a

radiação UV, permitindo a passagem apenas de comprimentos de onda acima de 290 nm. A irradiância empregada nos ensaios foi de 55 W/m<sup>2</sup>, com dose fixa de 396 KJ/m<sup>2</sup> – equivalente a um período de irradiação de duas horas – e temperatura controlada em 35°C, evitando o superaquecimento das amostras (ALONSO *et al.*, 2009; COSMETICS EUROPE, 2011).

A avaliação da fotoestabilidade das formulações foi calculada pela comparação entre os valores *in vitro* de atividade antioxidante, FPS estimado e comprimento de onda crítico obtidos antes e após a etapa de irradiação das amostras (CHOQUENET *et al.*, 2009; COSMETICS EUROPE, 2011).

#### **4.7. Estudo de Estabilidade das formulações**

As formulações fotoprotetoras multifuncionais de melhor desempenho nos estudos de caracterização funcional *in vitro* foram submetidas ao Estudo de Estabilidade, com avaliação de suas características físicas, físico-químicas e funcionais após 90 dias de sua manipulação.

Amostras das formulações foram armazenadas em bisnagas plásticas opacas com tampa tipo flip-top, sob o abrigo de luz, em geladeira (5,0 ± 0,5°C), temperatura ambiente (25,0 ± 0,5°C) ou estufa (40,0 ± 0,5°C / 75% UR) (BRASIL, 2004).

Após o período de armazenamento, as formulações foram avaliadas de acordo com os seguintes parâmetros: **(i)** características organolépticas (aspecto, cor e odor); **(ii)** valor de pH; **(iii)** viscosidade aparente; **(iv)** atividade antioxidante *in vitro*; **(v)** eficácia fotoprotetora *in vitro*; e **(vi)** fotoestabilidade (ALONSO *et al.*, 2009; BRAND-WILLIAMS, 1995; BRASIL, 2004; COSMETICS EUROPE, 2011).

#### **4.8. Ensaios *ex vivo* e *in vivo* – aspectos legais e éticos**

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em função da realização dos ensaios *ex vivo* e *in vivo* com voluntários. Os ensaios foram realizados em acordo com a Legislação Brasileira vigente, após a obtenção da aprovação do CEP, regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (BRASIL, 2012c).

Para cada participante desta pesquisa, foram fornecidas as informações e esclarecimentos necessários referentes a cada ensaio (etapas do estudo, objetivos, possíveis riscos, entre outros). O consentimento se deu por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), mantendo-se o anonimato do participante e garantindo a sua saída do estudo, voluntariamente, a qualquer momento (BRASIL, 2012c).

Previamente aos ensaios, os participantes foram entrevistados e avaliados considerando os critérios de inclusão e exclusão exigidos pela legislação vigente. Os critérios de inclusão foram os seguintes: **(i)** participantes saudáveis; **(ii)** ambos os sexos; **(iii)** idade entre 18 e 60 anos; **(iv)** pele íntegra na região de teste; e **(v)** concordância em aderir aos procedimentos do estudo, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão foram os seguintes: **(i)** gestação ou lactação; **(ii)** histórico de reações fototóxicas, fotoalérgicas ou patologias fotoinduzidas; **(iii)** histórico pessoal ou familiar de câncer de pele; **(iv)** uso de medicações anti-inflamatórias, imunossupressoras ou fotossensibilizantes - tópicas ou sistêmicas - até um mês antes do início do estudo; **(v)** presença de queimadura solar ou bronzado no local dos testes; **(vi)** tom de pele desigual na região do estudo; **(vii)** presença de dermatoses inflamatórias, lesões névicas, manchas, queratose seborréica, patologias ativas ou excesso de pelos no local do teste; e **(viii)** alergias conhecidas a qualquer componente das formulações (BRASIL, 2012c; COSMETICS EUROPE, 1997; MC NAMEE *et al.*, 2008).

Adicionalmente aos critérios expostos, também foi considerado, como critério de inclusão adicional, o fototipo de pele para os testes de eficácia fotoprotetora *in vivo*: especificamente, foram aceitos participantes com fototipo de pele entre I e III, de acordo com a escala de Fitzpatrick (COSMETICS EUROPE, 2006; JAPAN, 1995-1996; UNITED STATES, 2011).

As formulações empregadas nos ensaios *in vivo* e *ex vivo* foram, ainda, avaliadas com relação a sua qualidade microbiológica (contagem total de bactérias aeróbias, contagem total de fungos e leveduras e ausência dos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), de forma a garantir a sua segurança previamente à aplicação nos voluntários (BRASIL, 2010).

#### **4.9. Ensaios de Segurança das formulações**

As formulações fotoprotetoras multifuncionais de melhor desempenho nos ensaios *in vitro* foram avaliadas com relação à sua segurança clínica por meio dos ensaios epicutâneos (*patch tests*) de Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada, Sensibilização Dérmica, Fotoirritação Cutânea e Fotossensibilização Dérmica. Como controle negativo, utilizou-se água purificada.

No primeiro dia de cada ensaio, foi realizada a avaliação clínica da pele de cada participante, de forma a verificar os critérios estabelecidos para a sua inclusão / exclusão em cada estudo.

##### **4.9.1. Irritação cutânea primária e Irritação cutânea acumulada**

Os ensaios de irritação cutânea consistem em aplicação única (irritação cutânea primária) e contínua (irritação cutânea acumulada) do produto em teste, visando comprovar a ausência de irritação na população estudada.

O ensaio foi realizado com aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso de 55 participantes do estudo. O tempo de contato das formulações com a pele foi de 48 horas para o ensaio de irritação cutânea primária e três semanas (com troca do apósito contendo as formulações e o controle negativo a cada 48 horas) para o ensaio de irritação cutânea acumulada. Após cada troca do apósito, e ao final dos ensaios, a pele dos participantes foi avaliada com relação às possíveis reações de irritação (BRASIL, 2012a; COSMETICS EUROPE, 1997).

##### **4.9.2. Sensibilização dérmica**

O ensaio de sensibilização dérmica tem por objetivo comprovar a ausência de reações alérgicas por sensibilização (reações imunes de hipersensibilidade tardia) na população estudada, contemplando três fases: indução, repouso e desafio.

O ensaio foi realizado simultaneamente aos ensaios de irritação cutânea (*item 4.9.1.*), utilizando os mesmos participantes e amostras. Após o período de três semanas de contato das formulações e do controle negativo com a pele, durante o ensaio de irritação cutânea acumulada (período de indução), os

participantes ficaram em período de repouso de duas semanas, sem contato com as formulações em teste (período de repouso).

Em seguida, um novo apósito contendo as mesmas quantidades das formulações e do controle negativo foi aplicado no dorso dos participantes, em área onde nenhum apósito havia sido aplicado anteriormente (período de desafio). Após dois dias, o apósito foi removido, com avaliação das áreas referentes ao teste de desafio com relação a possíveis reações de sensibilização (BRASIL, 2012a, COSMETICS EUROPE, 1997).

#### **4.9.3. Fotoirritação cutânea**

O ensaio de fotoirritação tem por objetivo comprovar a ausência do potencial irritante de um produto aplicado na pele, quando exposto à radiação UVA. O ensaio foi realizado com aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso de 27 participantes do estudo. Após 24 horas, o apósito foi removido e os sítios de aplicação foram avaliados e submetidos a radiação UVA artificial, com irradiância de 10 mW/cm<sup>2</sup> e dose de 4 J/cm<sup>2</sup>, equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

Após 24 horas da irradiação, a pele dos participantes foi novamente avaliada com relação a possíveis reações de irritação induzidas pela radiação UVA (BRASIL, 2012a, COSMETICS EUROPE, 1997).

#### **4.9.4. Fotossensibilização dérmica**

O ensaio de fotossensibilização tem por objetivo comprovar a ausência de potencial alergênico (reações imunes de hipersensibilidade tardia) de um produto aplicado na pele, após exposição à radiação UVA. O estudo contempla três fases: indução, repouso e desafio.

O ensaio foi efetuado simultaneamente ao ensaio de fotoirritação (*item 4.9.3.*), utilizando os mesmos participantes e amostras. Durante o período de indução, com duração de três semanas, as formulações e o controle negativo foram aplicados de maneira oclusiva, no dorso dos participantes do estudo, duas vezes por semana. Após 24 horas de cada aplicação, o apósito foi removido e os sítios de aplicação foram avaliados e submetidos a radiação UVA artificial, com

irradiância de 10 mW/cm<sup>2</sup> e dose de 4,0 J/cm<sup>2</sup>, equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

Após o período de indução, os participantes entraram no período de repouso, com duração de duas semanas, onde não tiveram contato com as formulações ou receberam qualquer irradiação. Em seguida, foi iniciado o período de desafio, onde um novo apósito contendo as formulações e o controle negativo foi aplicado no dorso dos participantes, em área onde nenhum apósito havia sido aplicado anteriormente. Após 24 horas, o apósito foi removido e a área foi avaliada e submetida a radiação UVA com as mesmas especificações utilizadas na fase de indução. Por fim, após 24 horas da irradiação, as áreas referentes ao teste de desafio foram avaliadas com relação a possíveis reações de fotossensibilização (BRASIL, 2012a; COSMETICS EUROPE, 1997).

As possíveis reações decorrentes da aplicação das formulações foram acompanhadas por médico dermatologista, durante e após o período de cada estudo, e interpretadas de acordo com a escala de Draize, que avalia a presença de eritema ou edema nas áreas de teste, conforme a **Tabela 3** (DRAIZE; WOODWARD; CALVERY, 1944; COSMETICS EUROPE, 1997).

**Tabela 3:** Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea

Parâmetros	Respostas da pele	Escala
Formação de eritemas	Ausência de eritema	0
	Eritema leve	1
	Eritema bem definido	2
	Eritema moderado a severo	3
	Eritema grave, com formação de escaras	4
Formação de Edemas	Ausência de edema	0
	Edema leve (apenas visível)	1
	Edema leve (contornos nítidos)	2
	Edema moderado (espessura inferior a 1 mm)	3
	Edema grave (espessura superior a 1 mm)	4



#### 4.10. Caracterização funcional *ex vivo* das formulações

A caracterização funcional *ex vivo* foi realizada por meio da técnica de *tape stripping*, conforme método descrito por Alonso e colaboradores (2009), com modificações. Avaliou-se a atividade antioxidante da epiderme, após tratamento com as formulações de melhor desempenho nos ensaios *in vitro*.

Alíquotas de 2,0 mg/cm<sup>2</sup> das formulações em estudo foram aplicadas uniformemente no antebraço de 10 voluntários, em áreas previamente delimitadas (9,0 cm<sup>2</sup>) e limpas com água purificada (**Figura 11**). Duas aplicações consecutivas de cada formulação foram realizadas, com intervalo de duas horas entre elas, conforme as recomendações vigentes para reaplicação de protetores solares (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

**Figura 11:** Esquema de demarcação e aplicação das formulações no antebraço dos participantes, previamente à técnica de *tape stripping*



**Legenda:** NI = fitas não irradiadas após remoção; IR = fitas irradiadas após remoção.

As formulações foram aplicadas de forma randomizada no antebraço dos participantes, visando reduzir possíveis fontes de erro que pudessem influenciar os resultados obtidos

Duas horas após a última aplicação, foi efetuada a técnica de *tape stripping* para remoção do estrato córneo do antebraço dos participantes, utilizando-se 20 fitas do tipo Scotch Magic™ Tape (2,0 x 2,0 cm, 3M®) para cada área demarcada. Para obtenção do estrato córneo irradiado, as fitas removidas foram submetidas a radiação UV em câmara de fotoestabilidade equipada com lâmpada de xenônio (1500 W) e filtro de vidro responsável por mimetizar a radiação UV, permitindo a passagem apenas de comprimentos de onda acima de 290 nm. A irradiância empregada no ensaio foi de 55 W/m<sup>2</sup>, com dose fixa de 396 KJ/m<sup>2</sup> – equivalente a um período de irradiação de duas horas – e temperatura controlada em 35°C, evitando o superaquecimento das amostras (ALONSO *et al.*, 2009; COSMETICS EUROPE, 2011).

Após o *tape stripping*, as fitas foram armazenadas em tubos de centrífuga, correspondentes a cada área do antebraço, e tratadas com alíquotas de 15 mL de metanol. A extração do estrato córneo pelo solvente foi realizada em duas etapas: maceração das fitas por 17 horas e posterior extração em banho de ultrassom por 60 minutos.

Os extratos contendo cada porção de estrato córneo foram avaliados com relação à sua atividade antioxidante por meio da redução do radical livre DPPH. Alíquotas de 2,0 mL das amostras foram transferidas para tubos de centrífuga, com adição de 2,0 mL de solução metanólica de DPPH• a 140,0 µM. Os tubos de centrífuga foram agitados vigorosamente e permaneceram em repouso à temperatura ambiente (22,0 ± 2,0 °C) e ao abrigo de luz.

Após 60 minutos de reação, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Metanol foi utilizado como controle negativo.

A atividade antioxidante do estrato córneo, tratado ou não com as formulações, foi expressa por meio da porcentagem de redução do DPPH• pelas amostras, de acordo com a **Equação 5**.

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs estrato córneo}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

**Equação 5:** Cálculo da porcentagem de redução do radical livre DPPH. Na qual:

*Abs controle* = absorvância da solução de DPPH• preparada com o controle negativo (metanol);

*Abs estrato córneo* = absorvância da solução de DPPH• preparada com o estrato córneo, tratado ou não com a formulação em teste.

#### 4.11. Caracterização funcional *in vivo* das formulações

A caracterização funcional *in vivo* foi realizada por meio da avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção UVA (UVA-PF), metodologias atualmente validadas e aceitas para a avaliação da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas (BRASIL, 2012b; COSMETICS EUROPE, 2006; 2011; UNITED STATES, 2011).

A eficácia fotoprotetora contra a radiação UVB foi determinada pelo cálculo do FPS *in vivo*, avaliado por meio da dose eritematógena mínima (DEM) requerida para a produção do primeiro eritema na pele dos voluntários, após exposição à radiação UVB artificial (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

Alíquotas de 2,0 mg/cm<sup>2</sup> das formulações de melhor desempenho nos ensaios *in vitro*, e do padrão (formulação com FPS conhecido), foram aplicadas uniformemente no dorso de 10 voluntários, em áreas previamente delimitadas (35,0 cm<sup>2</sup>) e limpas com algodão seco. Após 15 minutos de secagem, as áreas de aplicação foram submetidas a irradiação UVB artificial, com dose definida de acordo com o FPS estimado das formulações e a DEM individual de cada participante (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

A DEM requerida para cada voluntário e cada área de aplicação foi obtida por uma sequência de exposição à luz ultravioleta, com dose aumentada em progressão geométrica, sendo cada exposição graduada com aumento de 12% em relação à anterior (JAPAN, 1995-1996; UNITED STATES, 2011).

Após 16 a 24 horas da irradiação, as áreas de aplicação foram avaliadas por pesquisador validado quanto ao teste e o cálculo do FPS *in vivo* foi realizado conforme a **Equação 6** (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEMp}}{\text{DEMnp}}$$

**Equação 6:** Fator de proteção solar (FPS) *in vivo*. Na qual:

*DEMp* = dose eritematogena mínima na pele protegida pela amostra ou formulação padrão;

*DEMnp* = dose eritematogena mínima na pele não protegida.

A eficácia fotoprotetora contra a radiação UVA foi determinada pelo cálculo do UVA-PF, com emprego da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (COSMETICS EUROPE, 2011; UNITED STATES, 2011). O ensaio utilizou as mesmas condições analíticas e substratos empregados nas análises de eficácia fotoprotetora *in vitro* (item 4.5.2.), com etapa adicional de irradiação em câmara de fotoestabilidade, com temperatura controlada em 35°C, evitando o superaquecimento das amostras, e irradiância de 55 W/m<sup>2</sup>.

Os resultados de absorbância das amostras foram tratados pelo programa UV-2000®, em intervalo de comprimento de onda de 320 a 400 nm e taxa de progressão de 1,0 nm, com conversão dos dados em valores de UVA-PF. Foram empregadas, no mínimo, cinco leituras de transmitância por placa avaliada (COSMETICS EUROPE, 2011).

O valor de UVA-PF foi obtido por meio da **Equação 7** (COSMETICS EUROPE, 2011).

$$\text{UVAPF} = \frac{\int_{\lambda=320\text{nm}}^{\lambda=400\text{nm}} P(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=320\text{nm}}^{\lambda=400\text{nm}} P(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A(\lambda)*C} * d\lambda}$$

**Equação 7:** Fator de Proteção UVA (UVA-PF). Na qual:

*P*(λ) = eficácia pigmentogena espectral da CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*);

*I*(λ) = irradiância solar espectral;

*dλ* = intervalo dos comprimentos de onda;

*A*(λ) = absorbância espectral da amostra (após a etapa de irradiação);

*C* = coeficiente de ajuste entre os valores de FPS *in vivo* e *in vitro*, calculado pelo espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração.

A dose de radiação artificial empregada durante as análises, específica para cada amostra, foi calculada conforme a **Equação 8** e considerou o resultado de UVA-PF<sub>0</sub> (pré-irradiação) obtido para cada formulação em estudo (COSMETICS EUROPE, 2011).

$$D = UVAPF_0 \times D_0$$

**Equação 8:** Dose de radiação (D) aplicada às formulações fotoprotetoras. Na qual:

*UVAPF<sub>0</sub>* = fator de proteção UVA pré-irradiação, calculado pelo programa UV-2000®;

*D<sub>0</sub>* = fator de correção entre os resultados de UVA-PF *in vitro* e valor de PPD *in vivo* (*D<sub>0</sub>* = 1,2 J/cm<sup>2</sup>).

#### 4.12. Análise estatística dos resultados

O tratamento estatístico dos resultados, incluindo a análise do delineamento experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*), foi realizado pelo programa Minitab®, versão 17. As análises foram conduzidas de forma randomizada, em triplicata (com exceção dos ensaios realizados com voluntários, que utilizou como amostra o número de participantes avaliados) e com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ) para a determinação de resultados estatisticamente significativos (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

## *Resultados e Discussão*

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Atividade antioxidante do ácido ferúlico isolado

#### 5.1.1. Condições analíticas

O potencial antioxidante do ácido ferúlico e das formulações fotoprotetoras foi determinado por meio da redução do radical livre DPPH. Compostos antioxidantes reagem com o DPPH• doando um hidrogênio à molécula e, portanto, reduzindo-a, resultando em decréscimo nos valores de absorvância mensurados a 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995).

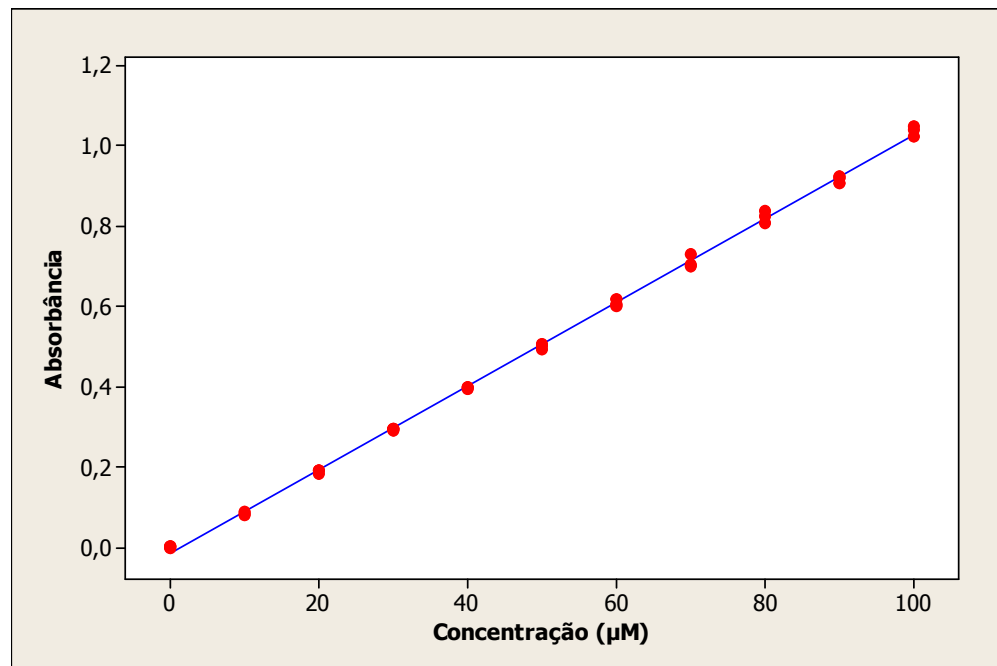
Sabendo-se que as condições do teste – tais como temperatura, exposição à luz, solvente utilizado e concentração da solução de DPPH• – causam interferências nos resultados da atividade antioxidante, foi realizada padronização destas variáveis, de forma a minimizar possíveis fontes de erro que pudessem influenciar o método empregado (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995; OZCELIK; LEE; MIN, 2003; SHARMA; BHAT, 2009).

Ozcelik, Lee e Min (2003) reportaram a influência da luz, oxigênio e temperaturas altas nos resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método do DPPH•. Segundo os autores, os parâmetros citados aumentaram a taxa de decomposição do radical livre, provocando alterações nos valores de absorvância. Com relação ao solvente empregado, Sharma e Bhat (2009) indicaram o uso de metanol, considerado o solvente de escolha para a análise de substâncias com características polares, além de proporcionar maior estabilidade ao radical livre DPPH, assim, favorecendo a acurácia dos resultados obtidos.

Outro parâmetro com influência significativa no referido ensaio é a concentração de DPPH•. De acordo com Molyneux (2004), a concentração das soluções deve fornecer valores de absorvância menores do que 1,0 (valor limite para a acurácia da leitura espectrofotométrica) e adequados para a observação do decaimento da absorvância característico da análise com o radical livre DPPH.

Desta forma, para definição da concentração ideal, foram preparadas dez soluções metanólicas de DPPH•, de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , para plotagem do gráfico de absorvância da molécula em função da sua concentração (**Figura 12**).

**Figura 12:** Absorbância das soluções metanólicas de DPPH• a 515 nm, em diferentes concentrações (10 a 100  $\mu\text{M}$ )



Pelo gráfico, visualiza-se a linearidade, evidenciada pelo teste estatístico de regressão indicando ajuste dos dados ao modelo linear (teste de *lack of fit* com valor de  $p > 0,05$ ). Assim, selecionou-se a concentração 70  $\mu\text{M}$  para a execução dos ensaios, não apenas devido à linearidade observada, mas, também, à absorbância da solução (próxima a 0,7 e no intervalo da acurácia espectrofotométrica), adequada para a observação do decaimento dos valores de absorbância (SHARMA; BHAT, 2009).

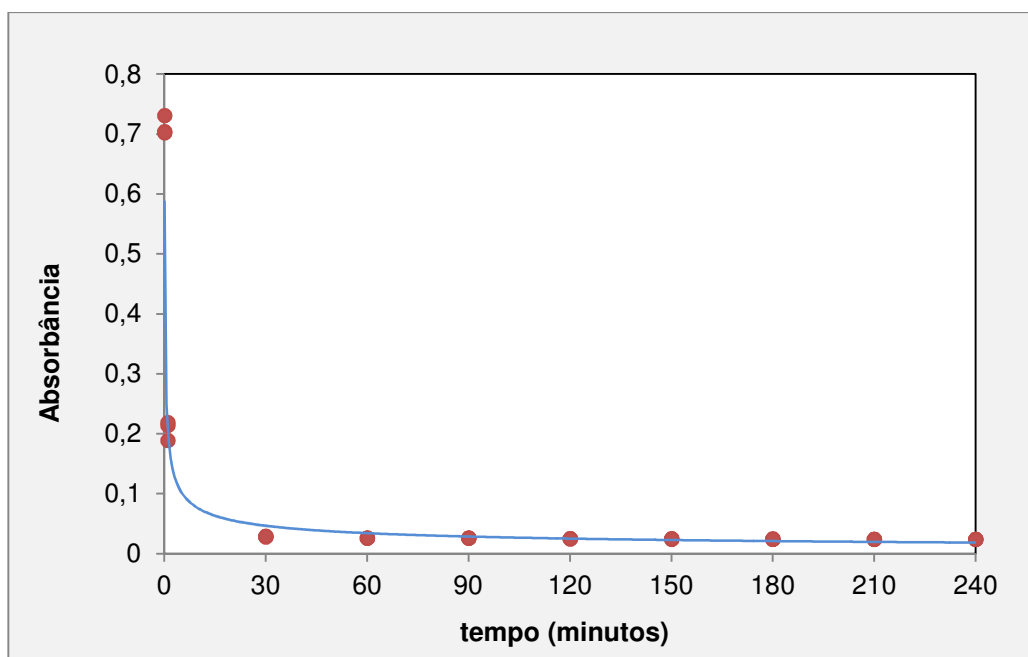
O último parâmetro padronizado foi o tempo de reação necessário para a completa redução do radical livre DPPH pelo composto bioativo. Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) demonstraram que a cinética de reação do radical livre DPPH depende do tipo de antioxidante utilizado, sendo observados três comportamentos distintos: cinética rápida (com a redução completa do radical livre após um minuto de reação); cinética intermediária (com tempos de reação variando entre 5 e 30 minutos); e cinética lenta (com tempos de reação acima de 30 minutos).

Para a avaliação da cinética de reação entre o DPPH• e o ácido ferúlico, solução metanólica do composto bioativo a 1,0% (p/p) foi tratada com solução metanólica de DPPH à 70  $\mu\text{M}$ , em proporção de 1:39. A absorbância da solução



foi avaliada por um período de quatro horas, com leituras imediatamente após a reação e, posteriormente, a cada 30 minutos. O gráfico de absorvância da solução em função do tempo está representado na **Figura 13**.

**Figura 13:** Cinética de reação entre o ácido ferúlico e o DPPH•



Pelo gráfico, constatou-se que a amostra do ácido ferúlico com DPPH• atingiu valor de absorvância constante após o tempo de 60 minutos, indicando a total redução do radical livre pelo composto bioativo antioxidante.

Pelo exposto, os parâmetros padronizados para a realização das análises de atividade antioxidante foram os seguintes: **(i)** reações em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ), em tubos fechados e ao abrigo de luz; **(ii)** metanol como solvente para o preparo das soluções; **(iii)** concentração da solução metanólica de DPPH• de  $70 \mu\text{M}$ ; e **(iv)** tempo de reação de 60 minutos.

### 5.1.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do ácido ferúlico foi determinada pela porcentagem de redução do DPPH• pelo composto bioativo, considerando os parâmetros de teste definidos anteriormente. Foram preparadas soluções metanólicas do composto bioativo, em diversas concentrações, visando avaliar

se o potencial antioxidante observado apresentava comportamento concentração-dependente. A **Tabela 4** descreve os resultados.

**Tabela 4:** Atividade antioxidante das soluções metanólicas do ácido ferúlico, em diferentes concentrações

Concentração de ácido ferúlico (% p/p)	Atividade antioxidante (%)
Controle negativo (metanol)	0 <sup>A</sup>
0,1	90,64 ± 0,95 <sup>B</sup>
0,2	92,83 ± 0,62 <sup>C</sup>
0,3	94,18 ± 0,09 <sup>D</sup>
0,4	94,54 ± 0,16 <sup>D</sup>
0,5	94,65 ± 0,09 <sup>D</sup>
0,6	94,91 ± 0,09 <sup>D</sup>
0,7	94,91 ± 0,18 <sup>D</sup>
0,8	94,80 ± 0,24 <sup>D</sup>
0,9	95,01 ± 0,16 <sup>D</sup>
1,0	94,96 ± 0,09 <sup>D</sup>
Controle positivo (solução metanólica de BHT a 1,0% p/p)	92,29 ± 0,77 <sup>B</sup>

**Legenda:** Resultados de atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Por meio dos valores apresentados na **Tabela 4**, verificou-se que o ácido ferúlico apresentou potencial antioxidante relevante, acima de 90,0% para todas as concentrações testadas. Comparativamente ao BHT (controle positivo), composto antioxidante comumente utilizado em produtos cosméticos e alimentos, a atividade antioxidante do ácido ferúlico se mostrou superior, uma vez que 0,2% (p/p) de ácido ferúlico desenvolveu potencial antioxidante estatisticamente semelhante a 1,0% (p/p) de BHT.

Avaliando-se os resultados, considerou-se selecionar a concentração de 0,3% (p/p) de ácido ferúlico para compor o delineamento experimental (*DoE 2<sup>3</sup>*) do presente estudo, visto que o potencial antioxidante do composto bioativo não apresentou variação estatisticamente significativa em concentrações superiores.

No entanto, sabendo-se que a atividade antioxidante do ácido ferúlico é modificada em função do valor de pH do meio, optou-se por avaliar, previamente à definição do delineamento experimental, a influência deste parâmetro no potencial antioxidante do composto bioativo (ERDEMGIL *et al.*, 2007).

Os resultados de atividade antioxidante das soluções aquosas do ácido ferúlico (1,0% p/p), em função do valor de pH, estão na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Atividade antioxidante das soluções aquosas do ácido ferúlico em diferentes valores de pH

Valor de pH	Atividade antioxidante (%)
3,5 (pH original)	95,13 ± 0,29 <sup>A</sup>
5,0	92,45 ± 0,44 <sup>B</sup>
5,5	90,66 ± 0,54 <sup>C</sup>
6,0	86,13 ± 0,92 <sup>D</sup>
6,5	84,40 ± 0,34 <sup>E</sup>
7,0	81,43 ± 0,95 <sup>F</sup>
10,5 (meio alcalino)	1,99 ± 0,23 <sup>G</sup>

**Legenda:** Resultados de atividade antioxidante expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Os resultados comprovaram que a alcalinidade do meio foi diretamente relacionada à redução do potencial antioxidante do ácido ferúlico. Este fato é corroborado pelo estudo de Monti e colaboradores (2011), que evidenciaram a completa ionização da molécula do ácido ferúlico – e conseqüente perda da capacidade de doação de elétrons, responsável por neutralizar os radicais livres – em valores de pH acima de 9,0.

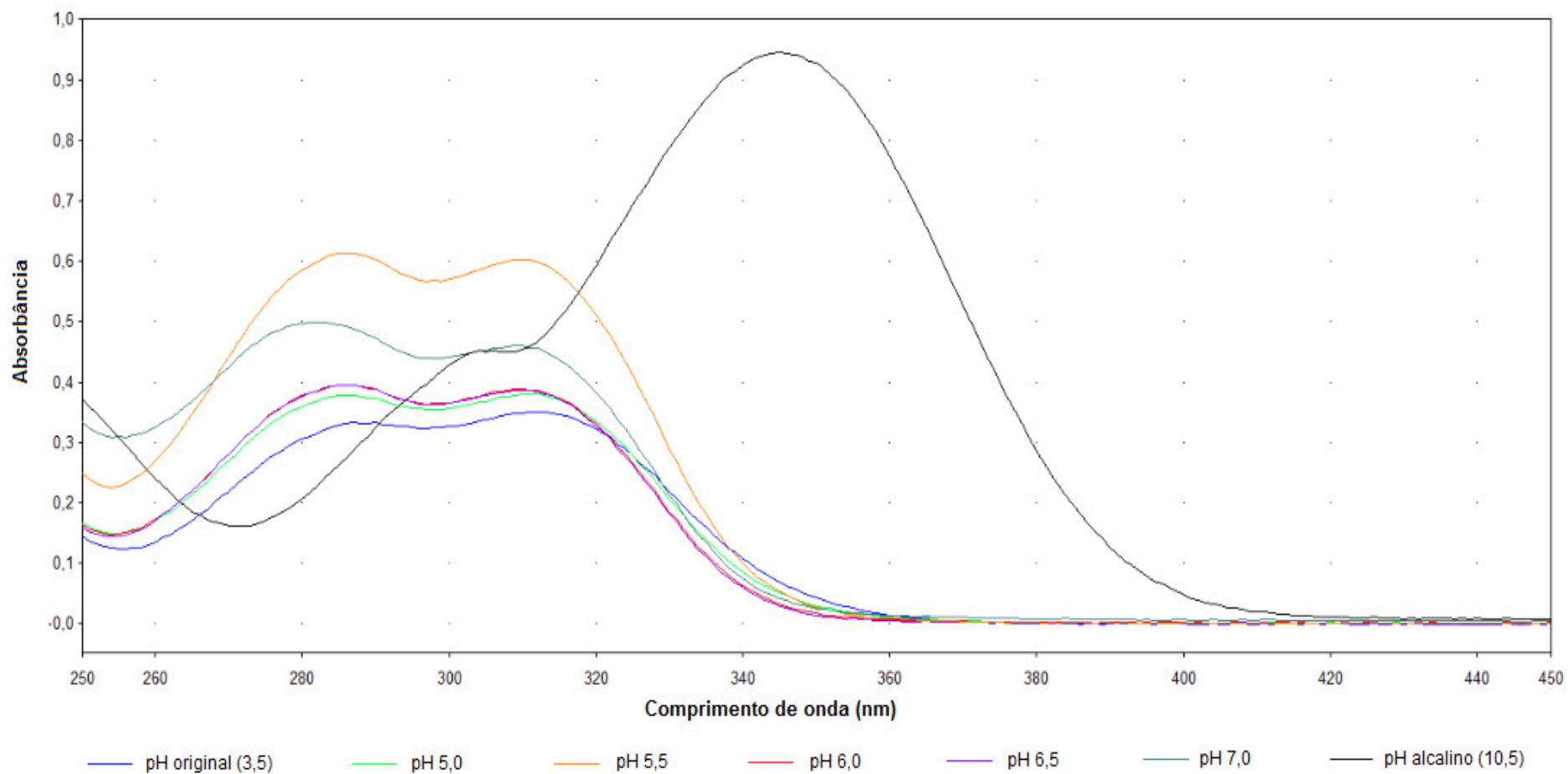
A varredura espectrofotométrica das soluções do ácido ferúlico em diversos valores de pH (**Figura 14**) demonstrou, ainda, que o composto bioativo em meio alcalino apresentou perfil espectral distinto, em comparação ao observado em meios ácidos e neutros, com pico máximo de absorbância na faixa do UVA (próximo a 340 nm). Ainda que este resultado seja interessante na aplicação do ácido ferúlico como filtro solar, este não foi considerado adequado

para o desenvolvimento de fotoprotetores multifuncionais, uma vez que a atividade antioxidante foi comprometida.

A mudança de perfil espectral do ácido ferúlico em meio alcalino pode ser explicada por alterações moleculares sofridas pelo composto bioativo neste meio – por exemplo, a ionização dos grupamentos carboxila e hidroxila ligados ao anel benzênico, fatores com influência comprovada na redução da atividade antioxidante da molécula (GRAF, 1992).

O estudo de Friedman e Jürgens (2000) corroborou este resultado e demonstrou, ainda, que o perfil de absorção do ácido ferúlico em função do valor de pH é reversível, indicando que ajustes neste parâmetro podem facilmente restaurar o potencial antioxidante da molécula.

**Figura 14:** Varredura espectrofotométrica das soluções aquosas de ácido ferúlico (50  $\mu\text{M}$ ) em diferentes valores de pH



Em suma, ainda que os resultados apresentados tenham comprovado a redução da atividade antioxidante do ácido ferúlico, optou-se pelo ajuste do valor de pH das formulações fotoprotetoras para valores levemente ácidos ( $6,5 \pm 0,5$ ), por razões farmacotécnicas e de segurança dos consumidores. Esta abordagem favoreceu não apenas a biocompatibilidade das formulações com a pele, mas, também, a correta incorporação e homogeneização do ácido ferúlico durante o preparo das emulsões, visto que o composto bioativo apresentou solubilidade superior na fase aquosa nos valores de pH selecionados.

Pelo exposto, considerando o enfoque farmacotécnico adotado e visando compensar possíveis perdas de atividade antioxidante devido ao valor de pH das formulações, optou-se por selecionar a concentração de 1,0% (p/p) do ácido ferúlico para compor as formulações fotoprotetoras desenvolvidas no delineamento experimental.

## **5.2. Desenvolvimento das formulações multifuncionais**

Na presente pesquisa, avaliou-se o impacto do ácido ferúlico, assim como sua interação com os filtros solares octil triazona e bemotrizinol, na eficácia funcional de formulações fotoprotetoras multifuncionais. O delineamento de experimentos do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*) foi utilizado para o desenvolvimento de oito emulsões (**F1** a **F8**) do tipo óleo em água (O/A), com obtenção de formulações macroscopicamente estáveis, com valor de pH biocompatível com a pele, viscosidade aparente adequada e características organolépticas (aspecto, cor e odor) ajustadas à sua finalidade (TANNER, 2006).

### **5.2.1. Estabilidade Preliminar das formulações**

A estabilidade das emulsões fotoprotetoras foi verificada por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico, utilizados para acelerar possíveis sinais de instabilidade inerentes aos sistemas emulsionados (BRASIL, 2004). A **Tabela 6** descreve os resultados para ambos os testes.

**Tabela 6:** Características organolépticas das formulações fotoprotetoras submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar

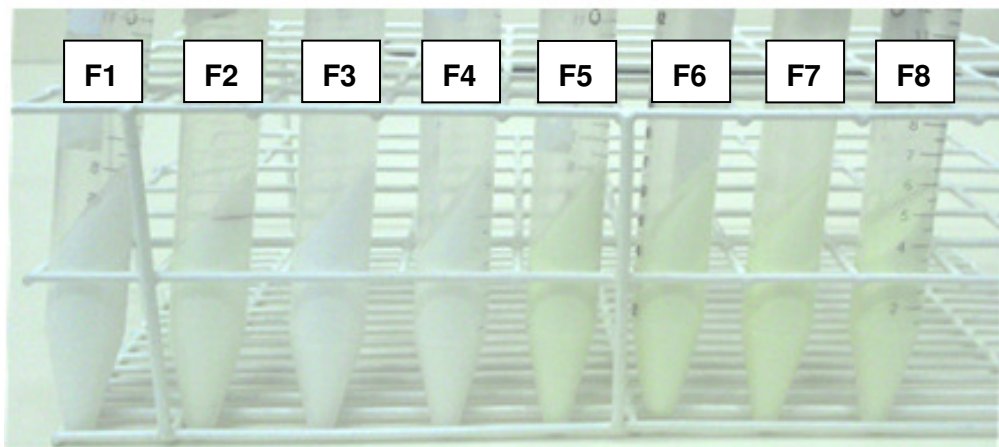
Formulações	Composição (compostos ativos e bioativo)	Estudo de Estabilidade Preliminar	
		Centrifugação	Estresse Térmico
F1	-	N	N
F2	AF	N	N
F3	OT	N	N
F4	OT + AF	N	N
F5	BT	N	N
F6	BT + AF	N	N
F7	OT + BT	N	N
F8	OT + BT + AF	N	N

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; N = normal; M = modificado.

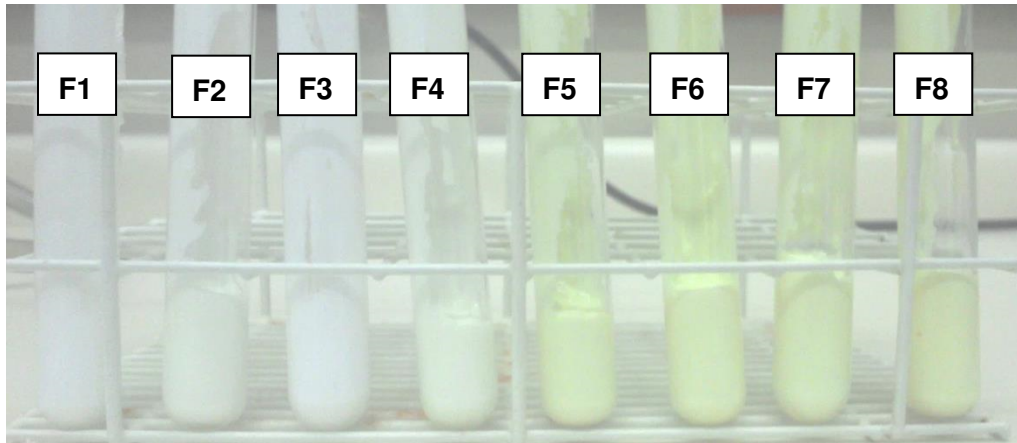
Conforme dados da **Tabela 6**, as formulações não apresentaram alterações após o Estudo de Estabilidade Preliminar, sendo, portanto, consideradas aprovadas para a realização das análises seguintes (caracterização física, físico-química, e eficácia funcional).

A **Figura 15** ilustra as formulações após o teste de Centrifugação, enquanto, a **Figura 16**, as formulações após o teste de Estresse Térmico.

**Figura 15:** Formulações fotoprotetoras após teste de Centrifugação



**Figura 16:** Formulações fotoprotetoras após teste de Estresse Térmico







### 5.3. Caracterização física e físico-química das formulações





As formulações fotoprotetoras foram analisadas visualmente, 24 horas após o preparo, quanto às suas características organolépticas (aspecto, cor e odor). Adicionalmente, as características físicas e físico-químicas das preparações foram mensuradas, respectivamente, por meio dos testes de viscosidade aparente e valor de pH. Os resultados estão expostos na **Tabela 7**.



**Tabela 7:** Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras multifuncionais

Formulações	Composição	Aspecto	Características organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente (cP)
F1	Base		Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico	$6,6 \pm 0,1^A$	$38333 \pm 945^B$
F2	Ácido ferúlico		Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico	$7,1 \pm 0,3^A$	$39700 \pm 500^B$
F3	Octil triazona		Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico	$6,5 \pm 0,3^A$	$39100 \pm 1539^B$
F4	Octil triazona e Ácido ferúlico		Emulsão homogênea, de coloração branca e odor característico	$6,6 \pm 0,1^A$	$36733 \pm 2122^B$

**Tabela 7 (continuação):** Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras multifuncionais

Formulações	Composição	Aspecto	Características organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente (cP)
F5	Bemotrizinol		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	$6,7 \pm 0,1^A$	$37933 \pm 1909^B$
F6	Bemotrizinol e Ácido ferúlico		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	$6,9 \pm 0,3^A$	$36500 \pm 1114^B$
F7	Octil triazona e Bemotrizinol		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	$6,8 \pm 0,6^A$	$38533 \pm 709^B$
F8	Octil triazona, Bemotrizinol e Ácido ferúlico		Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor característico	$6,8 \pm 0,3^A$	$39033 \pm 1570^B$

**Legenda:** Resultados de valor de pH e viscosidade aparente expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

As emulsões se apresentaram estáveis, com aspecto homogêneo e odor característico da base autoemulsificante. As formulações apresentaram coloração variando entre branco e amarelo, sendo a coloração amarela (observada nas formulações **F5** a **F8**) atribuída à presença do filtro solar bemotrizinol.

O valor de pH das amostras foi considerado adequado, estando próximo da faixa de biocompatibilidade com a epiderme. A **Tabela 7** descreve que as formulações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação a este parâmetro, devido ao ajuste do valor de pH das formulações, previsto na técnica de preparo.

O valor de viscosidade aparente também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as formulações, sendo considerado adequado para o uso proposto, segundo a pesquisadora e os dados referendados na literatura. As formulações apresentaram consistência elevada (acima de 36000 cP), parâmetro geralmente relacionado à estabilidade física do sistema (BRASIL, 2004). Os valores obtidos podem ser explicados devido à concentração da base autoemulsionante empregada (4,0% p/p), além da presença do composto Pemulen® TR2 (0,1% p/p), polímero com capacidade de elevar a consistência de formulações cosméticas, mesmo em baixas concentrações (RAVENEL, 2010; SEPPIC, 2011).

#### **5.4. Análise do Delineamento Experimental do tipo fatorial (*DoE 2<sup>3</sup>*)**

Na área da fotoproteção bioativa, fator de fundamental interesse é o sinergismo entre os compostos bioativos e os filtros solares. Neste segmento da pesquisa, o delineamento experimental do tipo fatorial se apresenta como importante ferramenta, auxiliando na avaliação das melhores combinações entre compostos para obtenção de formulações com menor concentração de filtros tradicionais, mas com manutenção da eficácia fotoprotetora.

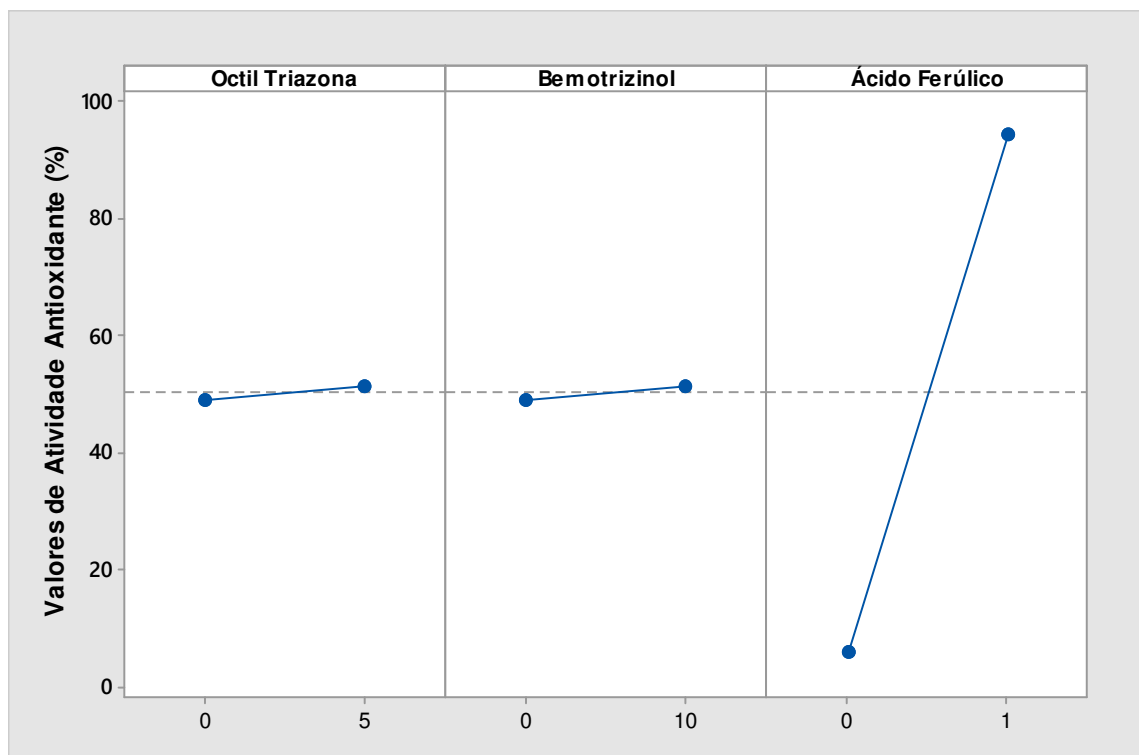
Por meio do delineamento experimental, foi possível determinar a influência de cada variável isolada (octil triazona, bemotrizinol e ácido ferúlico), e suas associações, nos resultados da atividade antioxidante e da transmitância da radiação UVA e UVB pelas formulações multifuncionais.

### 5.4.1. Atividade Antioxidante

O efeito de cada variável isolada na atividade antioxidante das formulações foi avaliado pelo gráfico de efeitos principais, representado na **Figura 17**. Neste gráfico, as variáveis com maior impacto na resposta apresentam retas com maiores inclinações, ou seja, apresentam respostas diferentes quando em concentrações diferentes.

O gráfico de efeitos principais (**Figura 17**) evidenciou que o ácido ferúlico foi o principal responsável pela atividade antioxidante das formulações, visto que, em concentrações mais elevadas, promoveu aumento significativo nos resultados de atividade antioxidante (maior inclinação e reta ascendente). Contrariamente, as demais variáveis (bemotrizinol e octil triazona) não apresentaram influências sobre o parâmetro avaliado.

**Figura 17:** Gráfico de efeitos principais para atividade antioxidante dos fotoprotetores multifuncionais

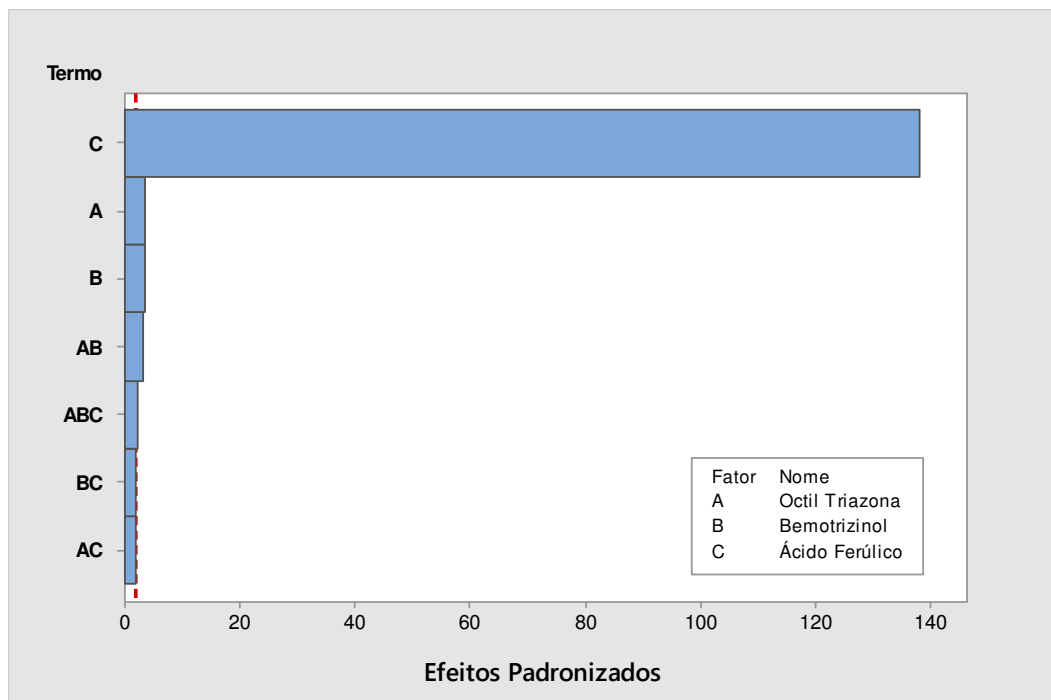


Ainda que o ácido ferúlico isoladamente tenha apresentado a principal influência nos resultados de atividade antioxidante das formulações, a análise do delineamento experimental também exige a avaliação das interações entre as variáveis independentes (bemotrizinol, octil triazona e ácido ferúlico).

Por intermédio do gráfico de Pareto de causa e efeito é possível determinar a magnitude e significância estatística de cada variável, e de suas associações, nos resultados obtidos no delineamento experimental. O gráfico apresenta barras que representam cada variável do experimento, bem como uma reta de referência indicativa do nível de significância do teste estatístico ( $\alpha = 0,05$ ). As variáveis são consideradas estatisticamente significativas em casos onde sua barra ultrapassa a reta de referência, sendo que, quanto maior a distância entre a reta e o final da barra, mais pronunciado é o efeito da variável no resultado.

Em relação à atividade antioxidante, verificou-se, pelo gráfico de Pareto (**Figura 18**) que as seguintes combinações foram significativas para os resultados obtidos: octil triazona e bemotrizinol, e octil triazona, bemotrizinol e ácido ferúlico.

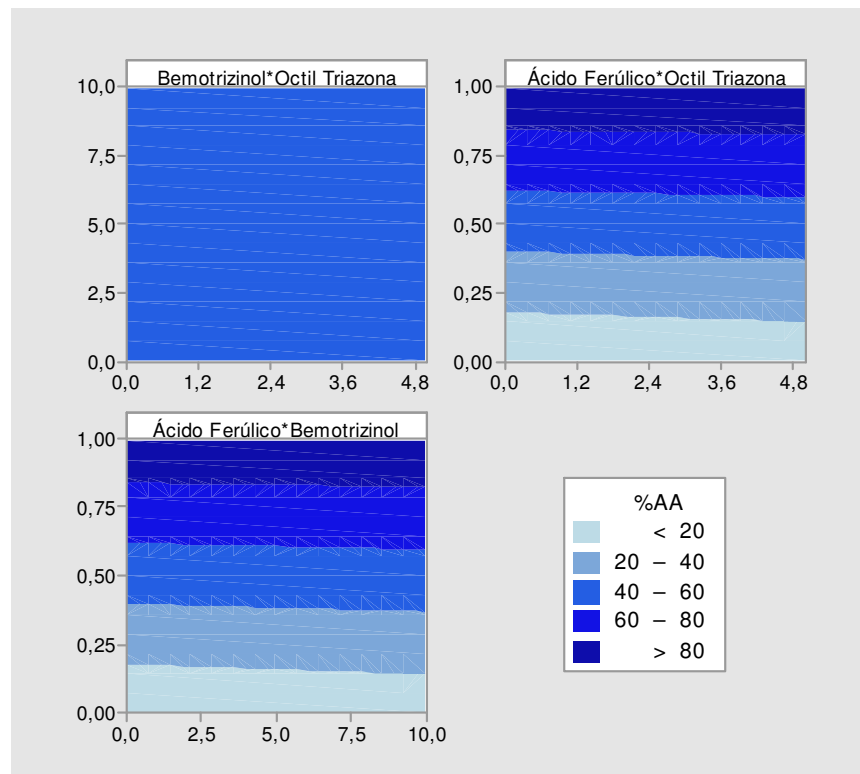
**Figura 18:** Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na atividade antioxidante dos fotoprotetores



Ainda que os filtros solares, isolados ou em associação, tenham influenciado positivamente a atividade antioxidante – provavelmente devido às suas moléculas estabilizadas por ressonância e seus grupamentos doadores de elétrons (SHAATH, 2010) –, constatou-se que o principal efeito foi proveniente do ácido ferúlico, fato evidenciado pela sua inclinação no gráfico de efeitos principais, e pela sua magnitude no gráfico de Pareto (cerca de 140 vezes mais distante da reta de referência, quando comparado aos demais fatores).

Finalizando a análise do delineamento experimental, os gráficos de contorno referentes à atividade antioxidante, ilustrados na **Figura 19**, permitiram determinar as combinações para maximizar a resposta obtida, além de demonstrar as interações estatisticamente significativas (representadas por curvaturas nos gráficos).

**Figura 19:** Gráficos de contorno relativos à análise de atividade antioxidante



Avaliando-se os gráficos na **Figura 19**, verificou-se que os melhores valores da atividade antioxidante (acima de 80%) foram obtidos nas máximas concentrações de ácido ferúlico, independente do filtro solar combinado ao

composto bioativo. Ainda, avaliando-se as inclinações presentes nos gráficos de interação entre o ácido ferúlico e os filtros octil triazona e bemotrizinol, constatou-se que o aumento da concentração dos filtros solares promoveu aumento da atividade antioxidante, fator esperado devido ao efeito de doação de elétrons combinado das duas moléculas, parâmetro com eficácia comprovada na redução de radicais livres (SHAATH, 2010).

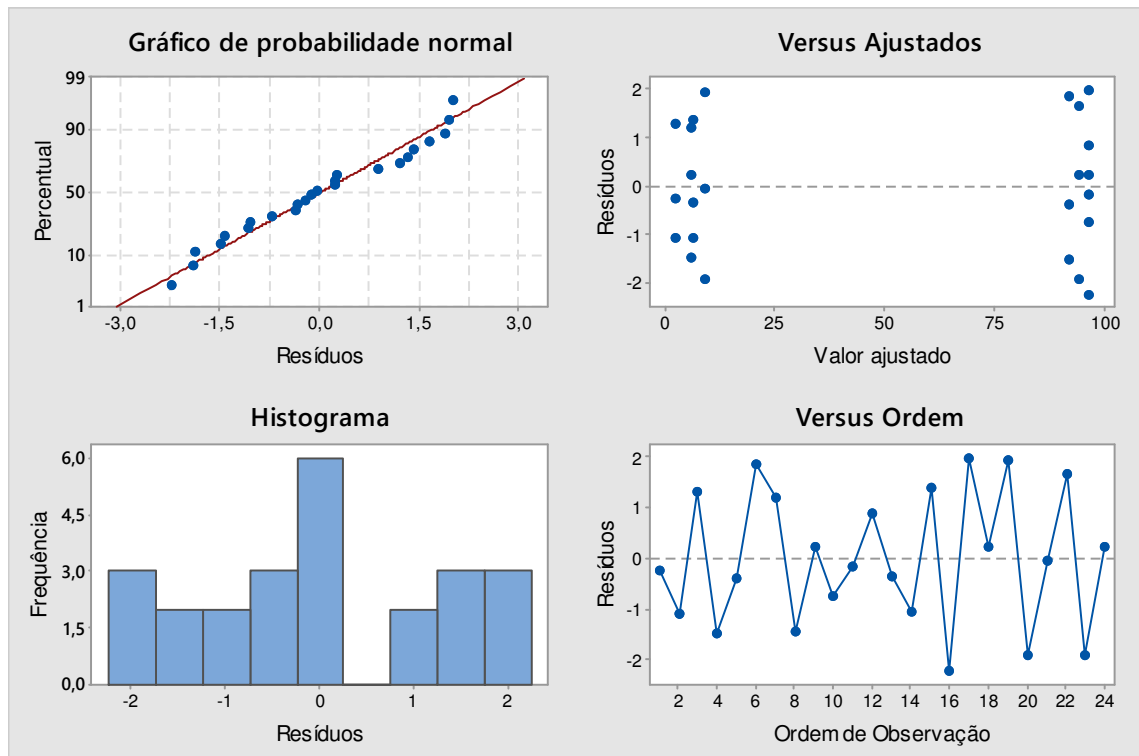
Por fim, a validade das inferências realizadas durante a análise do delineamento experimental deve ser comprovada pela avaliação dos resíduos, calculados pela diferença entre a resposta prevista (determinada a partir do modelo estatístico escolhido) e a observada (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

Considerando que resíduos podem ser pensados como elementos de variação inexplicados pelo modelo estatístico escolhido (no caso deste estudo, o delineamento experimental do tipo fatorial), podemos classificá-los como erros experimentais e, portanto, espera-se que eles se comportem como tal: apresentando distribuição normal, independência e variância constante (homocedasticidade) (MONTGOMERY, 2004).

A análise dos resíduos é uma parte fundamental de qualquer modelagem estatística, sendo responsável por validar as respostas e inferências obtidas. Em casos onde os resíduos indicam problemas no modelo estatístico, deve-se identificar a causa do resíduo e, em seguida, contabilizá-la no modelo original, levando a respostas mais precisas (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

Para a avaliação dos resíduos, utilizou-se o gráfico de resíduos do ensaio de atividade antioxidante, representado na **Figura 20**. O gráfico de probabilidade normal confirmou a normalidade dos resíduos, devido ao comportamento linear dos mesmos ao longo da reta representativa da resposta prevista. O histograma com características normais (formato típico de sino) corroborou a normalidade.

Com relação à homocedasticidade, os gráficos de dispersão dos resíduos, com distribuição tipicamente aleatória próxima da variância nula, evidenciou a homogeneidade da variância dos resíduos. Adicionalmente, a independência dos resíduos foi confirmada pelo gráfico de resíduos em função da ordem de observação, demonstrando que o tempo ou sequência de análise não influenciaram o comportamento dos resíduos (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

**Figura 20:** Gráfico de resíduos do ensaio da atividade antioxidante

Assim, a confirmação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, somada ao valor do coeficiente de correlação obtido para o delineamento experimental ( $R^2 = 99,88\%$ ), permitiu validar que o modelo estatístico proposto foi adequado para a predição da atividade antioxidante. A **Equação 9** estima o comportamento das formulações, dentro do universo estudado, em relação à atividade antioxidante.

#### Equação 9

$$\%AA = 2,193 + 0,775 OT + 0,396 BT + 89,64 AF - 0,0178 OT*BT + 0,1194 OT*BT*AF$$

Onde: **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **AF** = ácido ferúlico; \* = associações

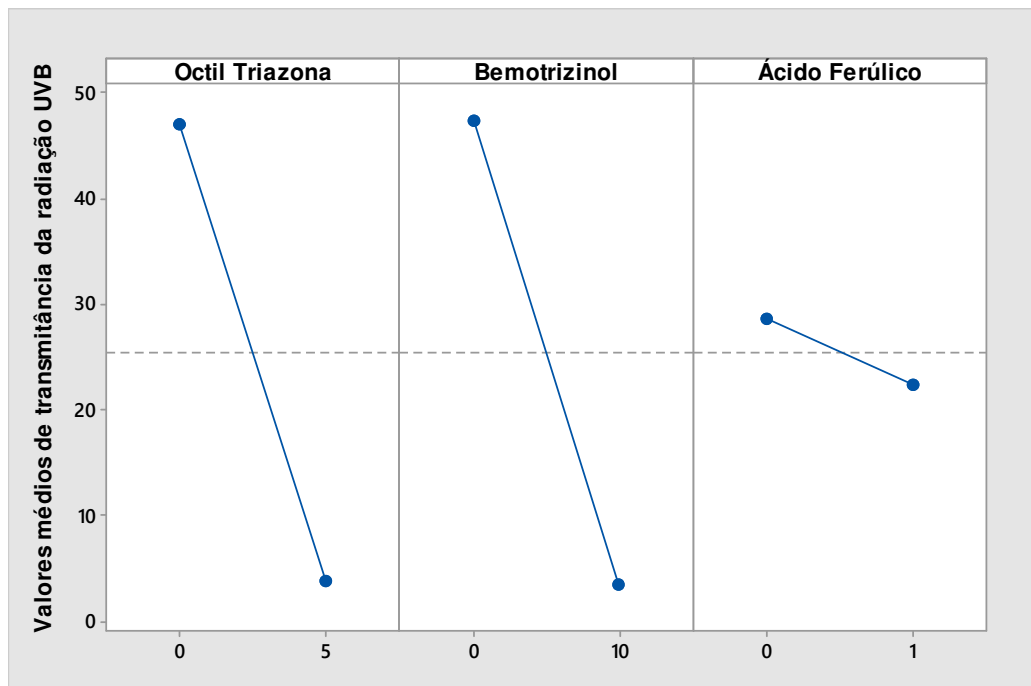
#### 5.4.2. Porcentagem de transmitância da radiação UVB (%TUVB)

O impacto dos filtros solares bemotrizinol e octil triazona na redução da transmitância da radiação UVB – parâmetro inversamente proporcional ao seu potencial absorvedor – foi comprovado pelo gráfico de efeitos principais,



representado na **Figura 21**. Pelo gráfico, observou-se que o bemotrizinol, filtro solar de amplo espectro, apresentou potencial de absorção da radiação UVB semelhante ao filtro octil triazona, exclusivamente UVB. Ainda que o bemotrizinol esteja presente em concentração duas vezes superior à octil triazona nas formulações, o efeito semelhante das moléculas pode ser explicado pelos seus coeficientes de absorvidade molar, parâmetro indicativo do potencial absorvedor de radiação UV: enquanto o bemotrizinol possui absorvidade molar de  $46800 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a octil triazona tem absorptividade igual a  $119500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , cerca de 2,5 vezes mais elevada (SHAATH, 2010).

**Figura 21:** Gráfico de efeitos principais representando o efeito de cada variável na transmitância da radiação UVB

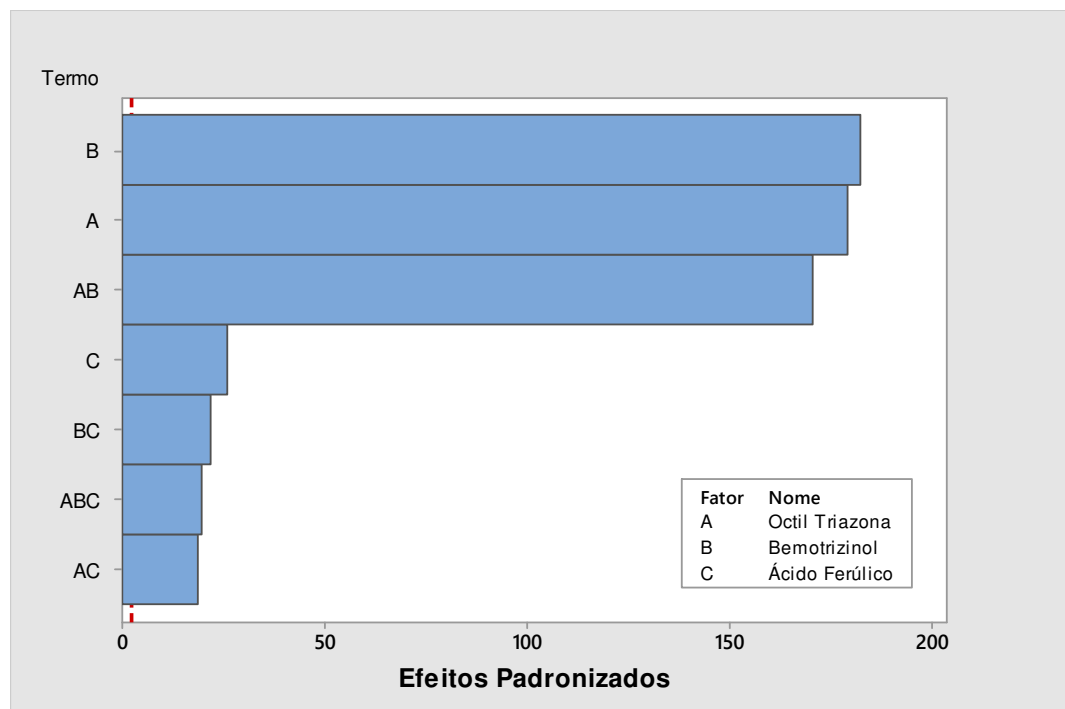


Ademais, observando-se a inclinação da reta referente ao ácido ferúlico, percebeu-se efeito estatisticamente significativo no aumento da absorção da radiação UVB, fator esperado considerando a estrutura molecular (presença de insaturações e grupamentos doadores de elétrons) e o efeito protetor contra eritemas do composto bioativo, indicativos de moléculas com atividade fotoprotetora (LIN *et al.*, 2005). Comparativamente aos filtros solares, a inclinação da reta referente ao ácido ferúlico indicou efeito menos pronunciado

deste composto na proteção contra a radiação UVB, fato que pode ser explicado pelas baixas concentrações do composto biotivo nas formulações fotoprotetoras (cinco vezes menor que a octil triazona e dez vezes menor que o bemotrizinol).

Após a avaliação do efeito de cada variável isolada na transmitância da radiação UVB, foi avaliada a influência das suas interações nos resultados obtidos. Por meio do gráfico de Pareto de causa e efeito (**Figura 22**), verificou-se que todas as interações foram estatisticamente significativas.

**Figura 22:** Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na transmitância da radiação UVB



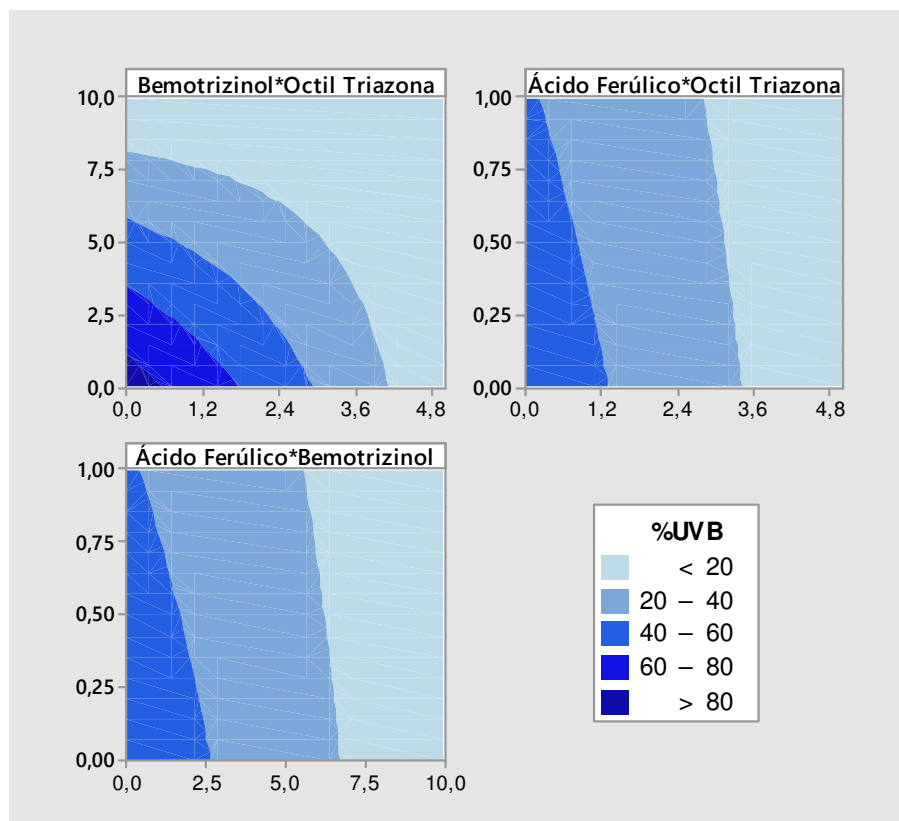
Os resultados comprovaram o efeito sinérgico do composto bioativo quando associado aos filtros solares em avaliação, comprovando a possibilidade de aplicação do ácido ferúlico em formulações fotoprotetoras multifuncionais com elevada proteção solar UVB. Tal perfil permite garantir, inclusive, o desenvolvimento de formulações mais seguras, pois favorece a substituição de filtros orgânicos sintéticos por compostos de origem natural, porém, mantendo-se a eficácia fotoprotetora.

Ademais, o gráfico de Pareto (**Figura 22**) corroborou o efeito isolado e combinado dos filtros solares bemotrizinol e octil triazona na absorção da radiação UVB, visto que as barras representativas destas variáveis apresentaram as três maiores magnitudes na representação gráfica.

Enfim, os gráficos de contorno referentes à transmitância da radiação UVB (**Figura 23**) demonstraram que os menores valores de transmitância foram obtidos nas máximas concentrações dos filtros solares octil triazona e bemotrizinol, sendo que, em concentrações elevadas de bemotrizinol, o efeito sinérgico da octil triazona se tornou ainda mais pronunciado (interação confirmada pela curvatura presente no gráfico de contorno referente à associação dos dois filtros solares).

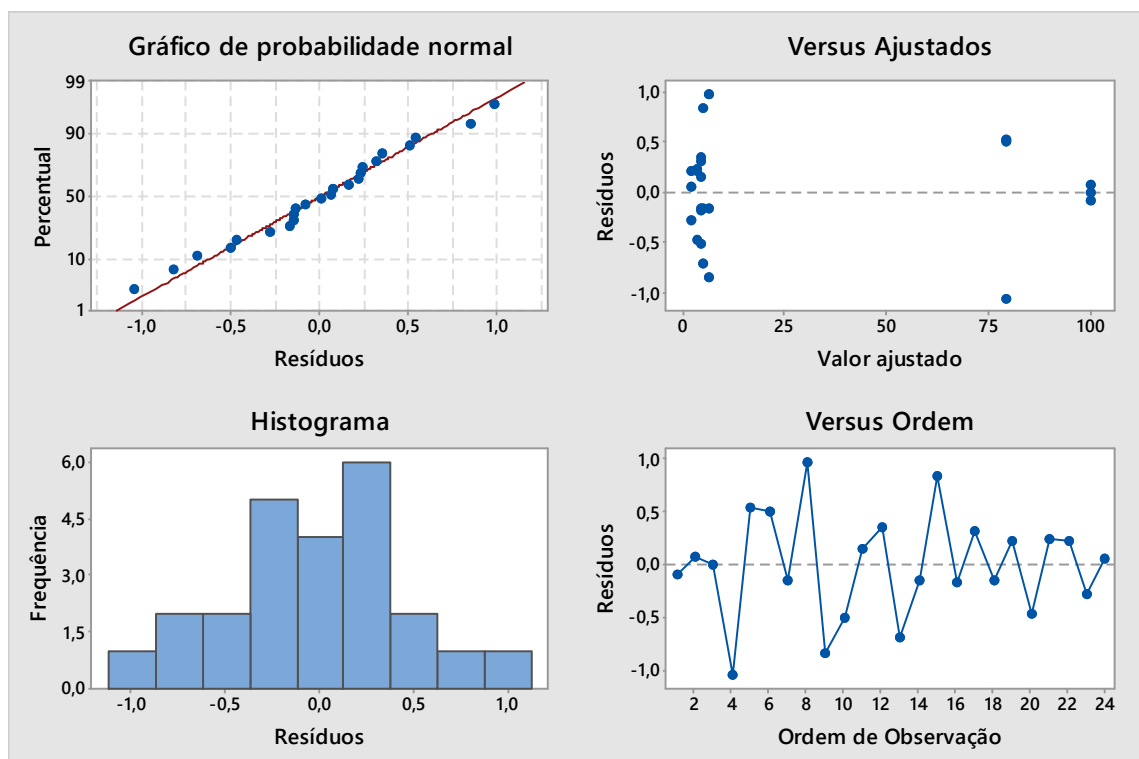
Adicionalmente, as curvaturas presentes nos gráficos de associação do ácido ferúlico com os filtros solares evidenciaram o efeito sinérgico do composto bioativo na redução da transmitância – e conseqüente aumento da absorbância – da radiação UVB.

**Figura 23:** Gráficos de contorno relativos à transmitância da radiação UVB



Por fim, a validade das inferências realizadas foi efetuada por meio dos gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVB (**Figura 24**). A linearidade dos pontos no gráfico de probabilidade normal e o histograma em formato de sino comprovaram a normalidade dos resíduos. Da mesma forma, os gráficos de dispersão dos resíduos evidenciaram distribuição aleatória próxima a variância nula, demonstrando a homocedasticidade e independência dos resíduos.

**Figura 24:** Gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVB pelos fotoprotetores multifuncionais



Em suma, a confirmação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, somada ao valor de coeficiente de correlação obtido para o delineamento experimental ( $R^2 = 99,98$ ), atestaram que o modelo estatístico proposto foi considerado adequado para predição da transmitância da radiação UVB. A **Equação 10** estima o comportamento das formulações, dentro do universo estudado, em relação à transmitância da radiação UVB.

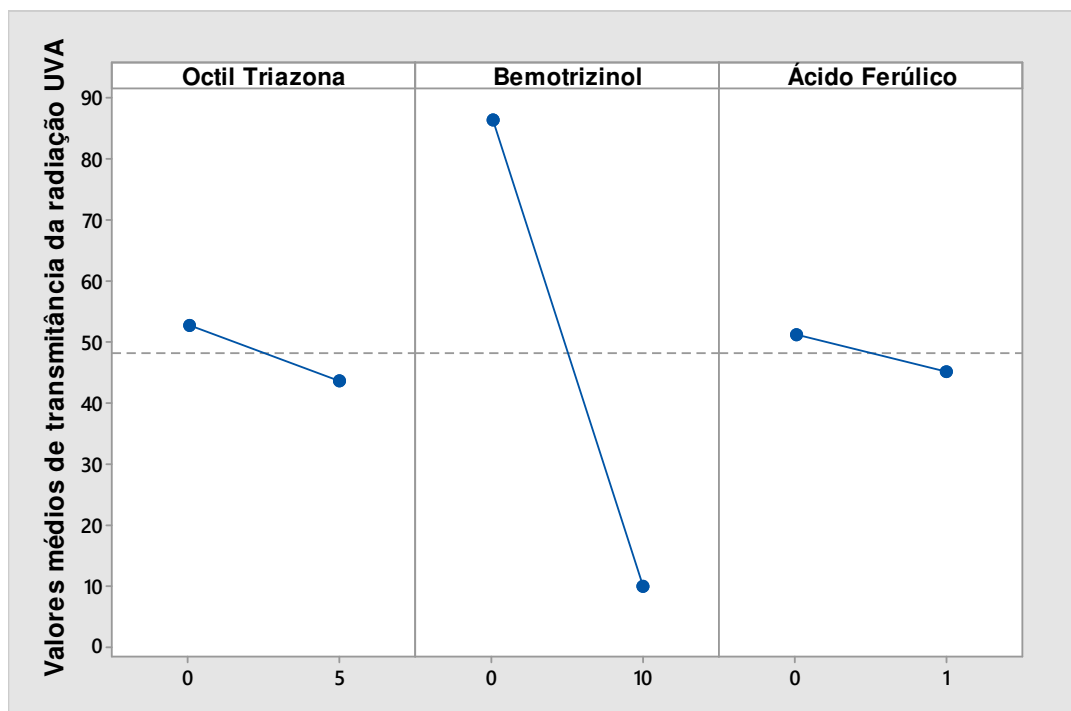
Equação 10
$\%T(UVB) = 99,923 - 18,6967 OT - 9,4990 BT - 20,673 AF + 1,8329 OT*BT + 3,677 OT*AF + 1,9903 BT*AF - 0,3756 OT*BT*AF$

Onde: **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **AF** = ácido ferúlico; \* = associações

#### 5.4.3. Porcentagem de transmitância da radiação UVA (%TUVA)

O gráfico dos efeitos principais, representado na **Figura 25**, comprovou o efeito do filtro solar bemotrizinol na redução da transmitância da radiação UVA, resultado esperado visto o caráter de absorção de amplo espectro do composto. No entanto, ainda que menos pronunciado, observou-se efeito significativo ao se avaliar o impacto do filtro solar octil triazona e do composto bioativo ácido ferúlico na redução da transmitância da radiação UVA, resultado relevante, considerando que os dois compostos apresentam maior potencial absorvedor para a radiação UVB (SAIJA *et al.*, 2000; TUCHINDA *et al.*, 2006).

**Figura 25:** Gráfico de efeitos principais representando o efeito de cada variável na transmitância da radiação UVA

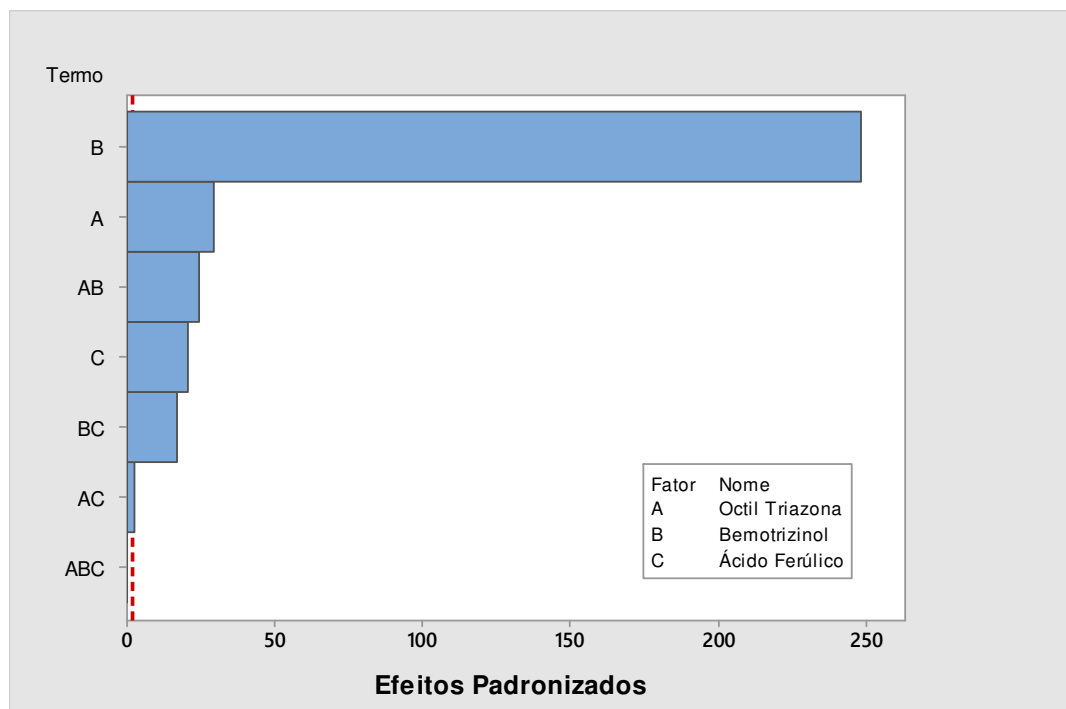


Após a avaliação do efeito de cada variável isolada sobre a porcentagem de transmitância da radiação UVA, foi analisada a influência das suas interações nos resultados obtidos. Por meio do gráfico de Pareto (**Figura 26**), constatou-se que as seguintes interações foram estatisticamente significativas: octil triazona e bemotrizinol, octil triazona e ácido ferúlico, e bemotrizinol e ácido ferúlico.

As interações entre as variáveis comprovaram que o ácido ferúlico atuou em sinergismo com os filtros solares, aumentando o seu potencial de absorção da radiação UVA. Este resultado foi considerado expressivo, visto que comprovou a eficácia da associação do composto bioativo com filtros solares, conforme requerido para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras de amplo espectro acrescidas de potencial antioxidante.

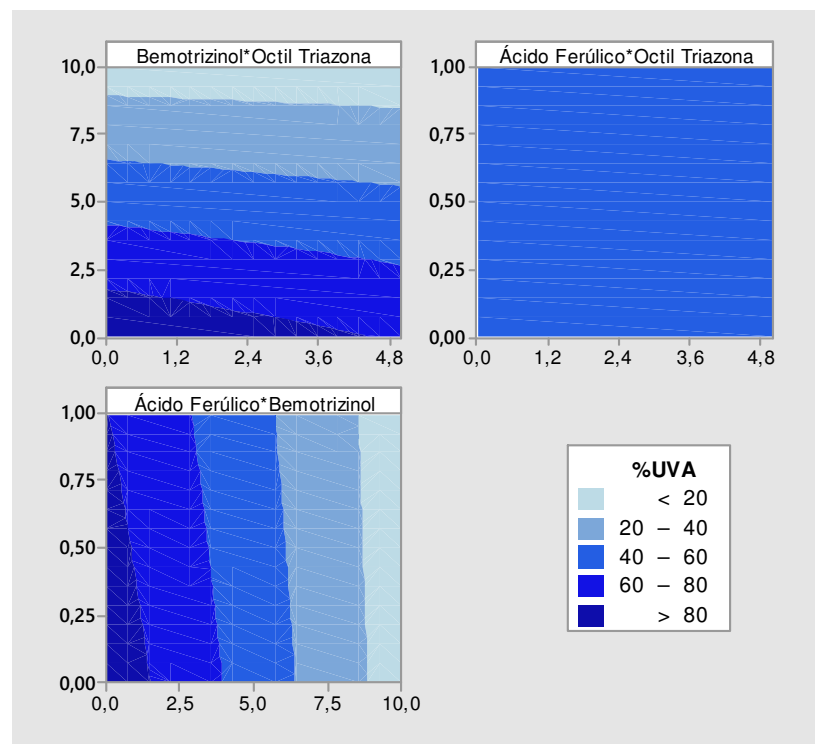
Adicionalmente, o gráfico de Pareto corroborou a influência positiva das variáveis isoladas – em especial o impacto do bemotrizinol – na absorção da radiação UVA, fato anteriormente evidenciado pelo gráfico de efeitos principais.

**Figura 26:** Gráfico de Pareto representando o efeito de cada variável, e suas combinações, na transmitância da radiação UVA



Os gráficos de contorno referentes à transmitância da radiação UVA (**Figura 27**) demonstraram que os menores valores de transmitância (abaixo de 20%) foram obtidos na máxima concentração do filtro solar bemotrizinol, sendo que, em concentrações reduzidas deste filtro, o efeito sinérgico da octil triazona e do ácido ferúlico se tornaram mais evidentes (interações confirmadas pelas curvaturas presentes nos gráficos de contorno referentes a estas associações). Este resultado foi devido, provavelmente, à capacidade absorvedora da radiação UVA apresentada pelo filtro bemotrizinol (com pico máximo de absorção à 343 nm e comprimento de onda crítico acima de 370 nm), responsável por inibir os pequenos, porém significativos, potenciais absorvedores da octil triazona e do ácido ferúlico em comprimentos de onda mais longos no espectro de absorção da radiação UV (TUCHINDA *et al.*, 2006).

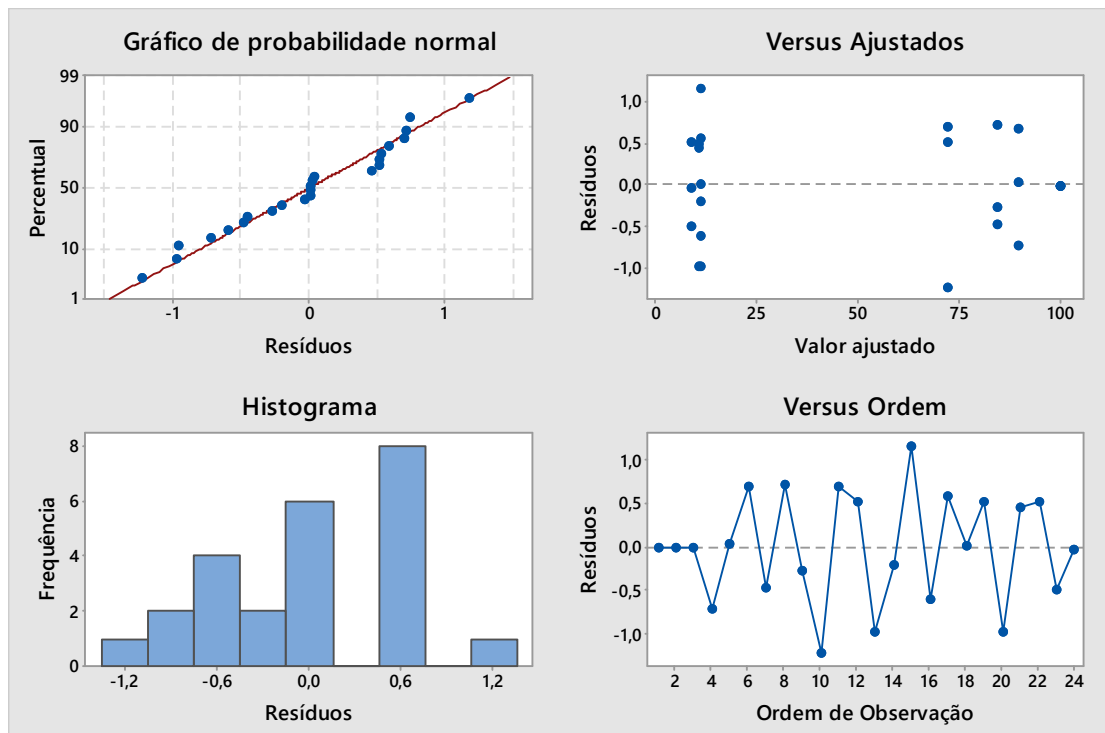
**Figura 27:** Gráficos de contorno relativos à transmitância da radiação UVA



Por fim, a validade das inferências realizadas foi efetuada por meio dos gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVA (**Figura 28**). A normalidade dos resíduos foi comprovada pela linearidade dos pontos no gráfico de probabilidade normal e pelo histograma com características normais

(formato similar a sino). A homocedasticidade e a independência dos resíduos foram confirmadas pelos seus gráficos de dispersão com comportamento aleatório próximo da variância nula e distribuição independente da ordem de observação.

**Figura 28:** Gráficos de resíduos relativos à transmitância da radiação UVA pelos fotoprotetores multifuncionais



Logo, a confirmação da normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, somada ao valor de coeficiente de correlação obtido para o delineamento experimental ( $R^2 = 99,96$ ), permitiu validar que o modelo estatístico proposto foi considerado adequado para predição da transmitância da radiação UVA. A **Equação 11** estima o comportamento das formulações, dentro do universo estudado, em relação à transmitância da radiação UVA.

#### Equação 11

$$\%T(\text{UVA}) = 100,000 - 3,144 \text{ OT} - 8,8920 \text{ BT} - 10,560 \text{ AF} + 0,2991 \text{ OT} \cdot \text{BT} - 0,365 \text{ OT} \cdot \text{AF} + 1,0240 \text{ BT} \cdot \text{AF}$$

Onde: **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **AF** = ácido ferúlico; \* = associações



Em suma, a análise do delineamento experimental com relação aos resultados de atividade antioxidante e transmitância das radiações UVA e UVB evidenciou o sinergismo entre os filtros solares empregados e o ácido ferúlico. Este fato corrobora o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras multifuncionais de maior segurança e competitividade de mercado, permitindo a substituição de filtros orgânicos sintéticos por compostos de origem natural, mantendo-se a eficácia fotoprotetora e agregando potencial antioxidante às preparações.

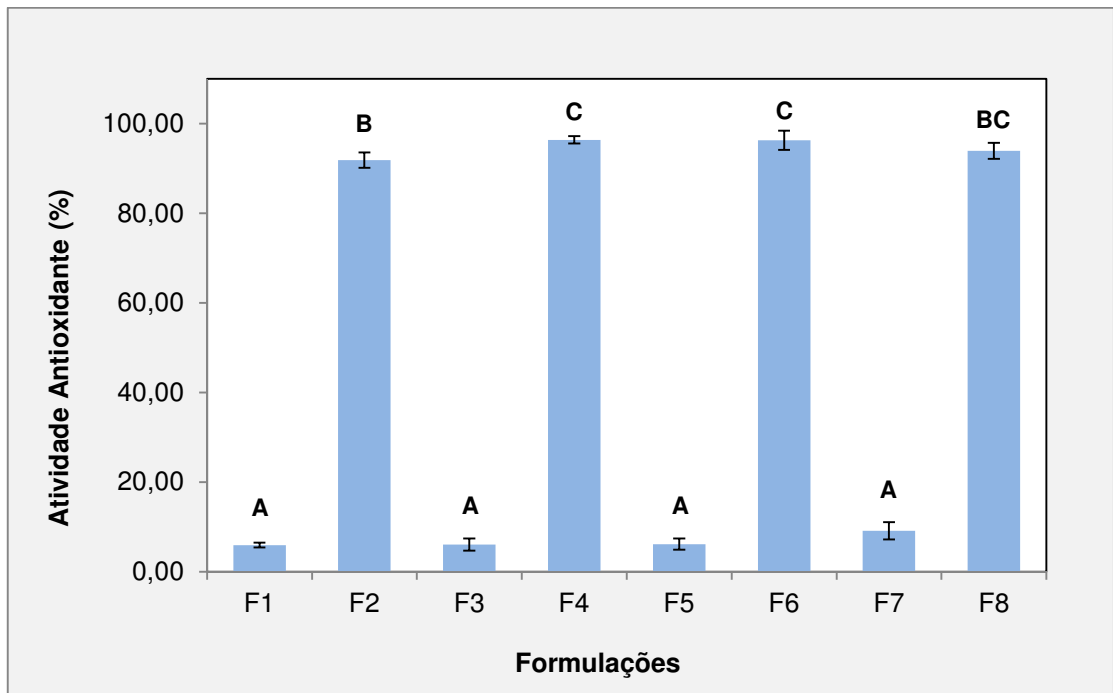
## **5.5. Caracterização funcional *in vitro* das formulações**

### **5.5.1. Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras foi determinada pelo método do radical livre DPPH, adotando-se os parâmetros de teste definidos no *item 5.1*. Previamente à leitura espectrofotométrica, 0,1 g das formulações foram incorporadas à 3,9 mL da solução metanólica de DPPH• (70 µM), com homogeneização até obtenção de solução límpida e sem partículas dispersas.

As formulações **F5**, **F6**, **F7** e **F8**, contendo o filtro solar bemotrizinol, apresentaram leve precipitação de partículas após homogeneização na solução de DPPH• e, portanto, foram submetidas à etapa de centrifugação, a 10.000 rpm por 20 minutos, com utilização da solução sobrenadante para a leitura espectrofotométrica a 515 nm.

Os resultados de atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras, expressos em porcentagem de redução do radical livre DPPH, estão descritos na **Figura 29**.

**Figura 29:** Atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras

**Legenda:** F1 = base; F2 = AF; F3 = OT; F4 = OT+AF; F5 = BT; F6 = BT+AF; F7 = OT+BT; F8 = OT+BT+AF. OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; AF = ácido ferúlico.

Resultados de atividade antioxidante expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes acima das barras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

A **Figura 29** indica que as formulações contendo o ácido ferúlico (**F2**, **F4**, **F6** e **F8**) apresentaram pronunciada atividade antioxidante, estatisticamente significativa quando comparadas às demais amostras em estudo. Estes resultados foram esperados, considerando a análise do delineamento experimental e o potencial antioxidante comprovado do composto bioativo, inclusive quando incorporado às formulações cosméticas (SAIJA *et al.*, 2010).

Ainda que o principal efeito seja devido ao ácido ferúlico, os resultados demonstraram que as amostras ausentes do composto bioativo também desenvolveram atividade antioxidante de cerca de 10%, provavelmente devido aos grupamentos doadores de elétrons dos filtros solares e às suas moléculas estabilizadas por ressonância (SHAATH, 2010).

### 5.5.2. Eficácia fotoprotetora

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. O tratamento dos dados de transmitância na faixa do UVA e UVB foi realizado pelo programa computacional acoplado ao equipamento (UV<sup>®</sup> 2000), responsável por converter os valores de transmitância em resultados estimados de FPS e comprimento de onda crítico (nm) das formulações. A **Tabela 8** descreve os dados de eficácia fotoprotetora estimada *in vitro*, enquanto a **Figura 30** ilustra as curvas de absorbância das formulações fotoprotetoras multifuncionais.

**Tabela 8:** Valores de FPS e comprimento de onda crítico *in vitro* dos fotoprotetores multifuncionais

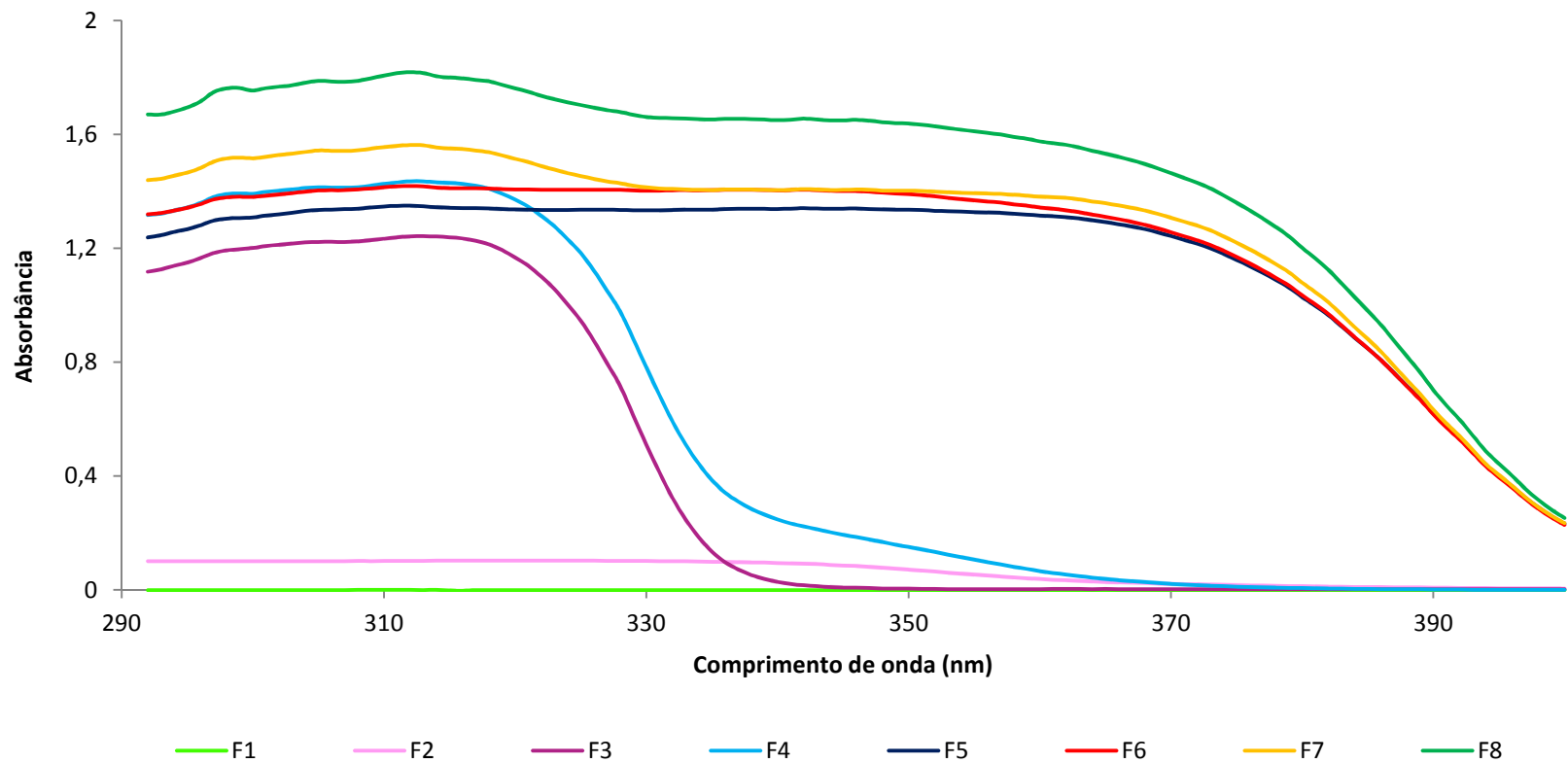
Formulações (Composição)	Fator de Proteção Solar estimado	Comprimento de onda crítico (nm)
<b>F1</b> (Base)	N.A.	N.A.
<b>F2</b> (AF)	1,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	357,7 ± 2,3 <sup>C</sup>
<b>F3</b> (OT)	8,3 ± 0,6 <sup>AB</sup>	326,0 ± 0,0 <sup>A</sup>
<b>F4</b> (OT + AF)	12,3 ± 0,6 <sup>BC</sup>	332,7 ± 0,6 <sup>B</sup>
<b>F5</b> (BT)	21,7 ± 3,5 <sup>CD</sup>	379,7 ± 0,6 <sup>D</sup>
<b>F6</b> (BT + AF)	25,0 ± 1,7 <sup>DE</sup>	379,0 ± 0,0 <sup>D</sup>
<b>F7</b> (OT + BT)	34,0 ± 4,4 <sup>E</sup>	379,0 ± 0,0 <sup>D</sup>
<b>F8</b> (OT + BT + AF)	53,7 ± 6,7 <sup>F</sup>	378,3 ± 0,6 <sup>D</sup>

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; N.A. = não aplicável.

Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

**Figura 30:** Curvas de absorbância dos fotoprotetores multifuncionais, mensuradas entre 290 e 400 nm (UVB e UVA)



**Legenda:** Ativos presentes nas formulações fotoprotetoras. **F1** = base; **F2** = ácido ferúlico; **F3** = octil triazona; **F4** = octil triazona e ácido ferúlico; **F5** = bemotrizinol; **F6** = bemotrizinol e ácido ferúlico; **F7** = octil triazona e bemotrizinol; **F8** = octil triazona, bemotrizinol e ácido ferúlico.

As formulações contendo o filtro solar bemotrizinol apresentaram os maiores valores de FPS *in vitro* e, em especial, de comprimento de onda crítico, sendo as formulações **F5**, **F6**, **F7** e **F8** consideradas de amplo espectro (valor de FPS acima de 15 e comprimento de onda crítico acima de 370 nm). Adicionalmente, enquanto a absorção das formulações contendo apenas o filtro octil triazona (**F3** e **F4**) abrangeu somente a região do UVB, o filtro bemotrizinol proporcionou formulações com espectro de absorção tanto na região do UVB quanto na região do UVA.

Com relação ao ácido ferúlico, todas as amostras que o continham apresentaram acréscimos de absorbância relevantes, que abrangeram não apenas a região do UVB (290 a 320 nm), mas, também, do UVA (320 a 400 nm). Este fato foi evidenciado pelos valores estimados de FPS, que apresentaram acréscimos de até 58% (formulação **F8**) na presença do composto bioativo, bem como pela ampliação do comprimento de onda crítico da formulação **F4**, indicando aumento na fotoproteção UVA quando o composto bioativo foi associado a um filtro exclusivamente UVB (octil triazona).

Tais respostas evidenciaram o potencial absorvedor do ácido ferúlico e indicaram efeito sinérgico do composto bioativo, quando associado a filtros solares, no aumento da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas.

Em relação à formulação **F1**, os resultados do FPS *in vitro* e do comprimento de onda crítico não puderam ser calculados, devido à proximidade de sua curva de absorbância da linha de base (**Figura 30**), fator que impediu a correta transformação dos dados pelo programa acoplado ao espectrofotômetro de refletância difusa. Avaliando-se a curva de absorção da formulação **F1** (base), percebeu-se, também, que os excipientes não interferiram na absorbância UVA ou UVB das formulações, resultado que permitiu a atribuição da eficácia fotoprotetora apenas aos filtros UV e ao composto bioativo utilizados.

### 5.5.3. Fotoestabilidade

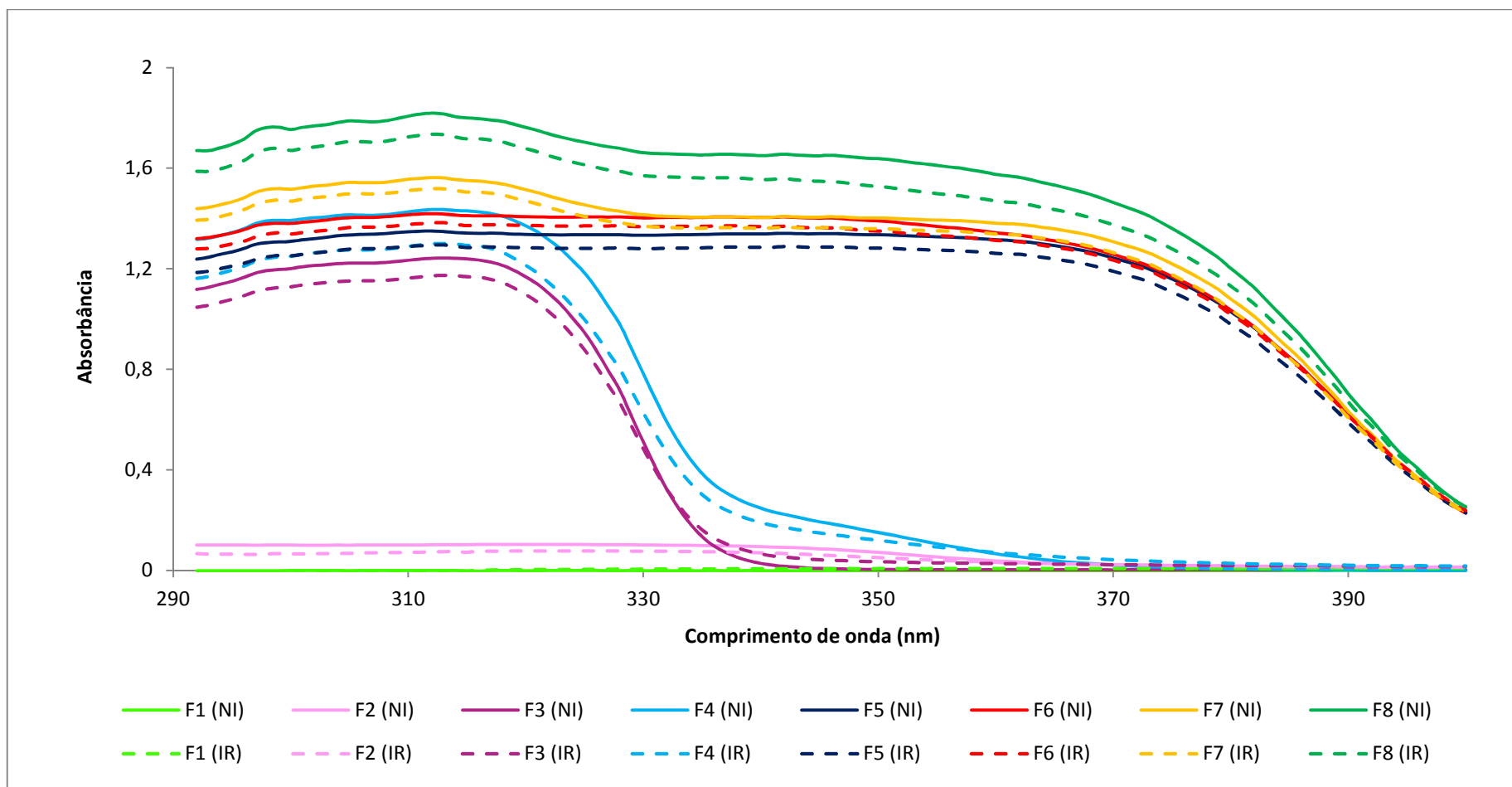
A fotoestabilidade das formulações foi determinada por meio da comparação entre os resultados da caracterização funcional *in vitro* obtidos antes e após a irradiação das amostras em câmara de fotoestabilidade. Os resultados estão descritos na **Tabela 9**, enquanto a **Figura 31** ilustra as curvas de absorbância das formulações pré e pós-irradiação.

**Tabela 9:** Caracterização funcional *in vitro* das formulações fotoprotetoras, antes e após irradiação UV artificial

Formulação (Composição)	Irradiação	Atividade Antioxidante (%)	Valor de <i>p</i>	Fator de Proteção Solar	Valor de <i>p</i>	Comprimento de onda crítico (nm)	Valor de <i>p</i>
<b>F1</b> (Base)	NI	5,93 ± 0,53	0,303	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	IR	6,44 ± 0,14		N.A.			
<b>F2</b> (AF)	NI	91,83 ± 1,71	0,192	1,0 ± 0,0	1,000	357,7 ± 2,3	0,007
	IR	95,24 ± 2,07		1,0 ± 0,0		368,3 ± 2,5	
<b>F3</b> (OT)	NI	6,07 ± 1,35	0,035	8,3 ± 0,6	0,184	326,0 ± 0,0	0,020
	IR	13,59 ± 1,15		7,7 ± 0,6		328,3 ± 0,6	
<b>F4</b> (OT + AF)	NI	96,37 ± 0,81	0,051	12,3 ± 0,6	0,015	332,7 ± 0,6	0,057
	IR	92,78 ± 1,94		9,7 ± 0,6		334,0 ± 1,0	
<b>F5</b> (BT)	NI	6,15 ± 1,27	0,131	21,7 ± 3,5	0,074	379,7 ± 0,6	0,184
	IR	9,11 ± 0,80		19,7 ± 3,2		379,0 ± 0,0	
<b>F6</b> (BT + AF)	NI	96,27 ± 2,12	0,593	25,0 ± 1,7	0,659	379,0 ± 0,0	0,423
	IR	97,48 ± 1,30		26,3 ± 4,9		379,3 ± 0,6	
<b>F7</b> (OT + BT)	NI	9,14 ± 1,92	0,930	34,0 ± 4,4	0,063	379,0 ± 0,0	1,000
	IR	8,95 ± 1,36		30,7 ± 3,1		379,0 ± 0,0	
<b>F8</b> (OT + BT + AF)	NI	93,94 ± 1,79	0,112	53,7 ± 6,7	0,015	378,3 ± 0,6	0,423
	IR	91,14 ± 1,99		44,0 ± 5,0		378,7 ± 0,6	

**Legenda:** **AF** = ácido ferúlico; **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **NI** = amostra pré-irradiação; **IR** = amostra pós-irradiação; **N.A.** = não aplicável. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Valores de *p* < 0,05 (em vermelho) representam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras irradiadas e não irradiadas. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student pareado (nível de significância = 0,05).

**Figura 31:** Curvas da absorbância dos fotoprotetores multifuncionais, mensuradas entre 290 e 400 nm, antes e após irradiação



**Legenda:** NI = amostras pré-irradiação; IR = amostras pós-irradiação; AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol.

Ativos presentes das formulações fotoprotetoras: F1 = base; F2 = AF; F3 = OT; F4 = OT+AF; F5 = BT; F6 = BT+AF; F7 = OT+BT; F8 = OT+BT+AF.

De acordo com os resultados da **Tabela 9** e da **Figura 31**, verificou-se que as formulações apresentaram fotoestabilidade funcional, já que a etapa de irradiação não causou alterações significativas em grande parte das amostras do estudo. No entanto, contrariamente ao esperado, este efeito não foi devido ao ácido ferúlico – cuja estrutura estabilizada por ressonância poderia retardar a fotodegradação dos filtros solares, ao atuar como “substrato de sacrifício” – mas sim ao perfil fotoestável dos filtros solares selecionados, em especial o bemotrizinol. Assim, nas condições do ensaio em relação à dose de irradiação e ao tempo de exposição, o ácido ferúlico não apresentou desempenho destacado (KOCKLER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2005).

Considerando os resultados de atividade antioxidante *in vitro*, percebeu-se que a influência da irradiação foi estatisticamente significativa apenas para a formulação **F3**, que apresentou potencial antioxidante duas vezes superior após exposição à radiação UV artificial. Este acréscimo pode ser devido à degradação da octil triazona e à obtenção de molécula(s) com atividade antioxidante superior; no entanto, o resultado não é corroborado pela literatura científica, visto que Damiani, Baschong e Greci (2007) indicaram efeito contrário para a irradiação deste filtro, com aumento de três vezes na geração de EROs e conseqüente redução nos valores da atividade antioxidante.

Ainda que a etapa de irradiação tenha provocado diminuição estatisticamente significativa no valor de FPS *in vitro* das formulações **F4** e **F8** – provavelmente devido a interação entre compostos de degradação provenientes do ácido ferúlico e da octil triazona – pode-se afirmar que a eficácia fotoprotetora das formulações foi mantida, uma vez que essas, em especial a formulação **F8**, apresentaram altos valores de FPS, mesmo após a irradiação.

Com relação ao comprimento de onda crítico, as formulações **F2** e **F3** apresentaram aumentos estatisticamente significativos após a etapa de irradiação; no entanto, sabendo-se que o comprimento de onda crítico é calculado pela área sob a curva das formulações no gráfico de absorvância da radiação UV, constatou-se que esse aumento representou um “falso positivo”, sendo devido à queda da fotoproteção UVB, e não ao aumento da fotoproteção UVA. Este fato é comprovado pela **Figura 31**, na qual as curvas referentes às duas formulações, após irradiação, apresentaram diminuição na absorção da radiação UV, quando comparadas às curvas não irradiadas.











Em suma, devido à proteção de amplo espectro, perfil fotoestável e eficácia funcional *in vitro* comprovada, além da presença de todos os compostos ativos e bioativo em avaliação (representando a totalidade do universo estudado), as formulações **F7** (octil triazona e bemotrizinol) e **F8** (octil triazona, bemotrizinol e ácido ferúlico) foram classificadas como de melhor desempenho e selecionadas para a continuidade dos estudos da presente pesquisa.

#### **5.6. Estudo de Estabilidade das formulações**

As formulações de melhor desempenho nos ensaios *in vitro* (**F7** e **F8**) foram submetidas ao Estudo de Estabilidade de 90 dias, com análise inicial e final, de forma a verificar possíveis sinais de instabilidade devido ao tempo e/ou condições de armazenamento. As características organolépticas, valor de pH e viscosidade aparente das formulações estão descritos na **Tabela 10**.

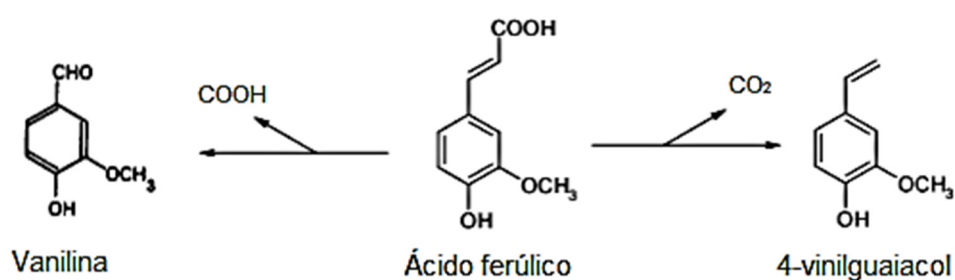
**Tabela 10:** Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações submetidas a estudo de estabilidade de 90 dias

Formulações	Tipo de Análise	Condição Inicial (t <sub>0</sub> )	Geladeira (t <sub>90</sub> )	Ambiente (t <sub>90</sub> )	Estufa (t <sub>90</sub> )
<b>F7</b> <i>(Octil triazona e Bemotrizinol)</i>	<b>Aspecto</b>				
	<b>Características Organolépticas</b>	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base
	<b>Valor de pH</b>	6,8 ± 0,6	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,3	6,9 ± 0,4
	<b>Viscosidade Aparente (cP)</b>	38533 ± 709	42967 ± 1767	41533 ± 416	38033 ± 2194
<b>F8</b> <i>(Octil triazona, Bemotrizinol e Ácido ferúlico)</i>	<b>Aspecto</b>				
	<b>Características Organolépticas</b>	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base	Emulsão homogênea, de coloração amarela e odor da base	Emulsão homogênea, de coloração alaranjada e odor de baunilha e cravo	Emulsão homogênea, de coloração marrom e odor de baunilha e cravo
	<b>Valor de pH</b>	6,8 ± 0,3	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2	7,4 ± 0,2
	<b>Viscosidade Aparente (cP)</b>	39033 ± 1570	43167 ± 635	45867 ± 58	42033 ± 643

As formulações contendo ácido ferúlico apresentaram degradação em temperatura ambiente e em estufa, caracterizada pelas suas colorações, variando entre o alaranjado e o marrom. Este fenômeno pode ser explicado pelas características moleculares do composto bioativo: estudos demonstraram que o ácido ferúlico é susceptível à degradação térmica e à fotodegradação, bem como fotoisomerização, formando o seu derivado *cis*, representado por um óleo de forte coloração amarelada (COGHE *et al.*, 2004; GRAF, 1992; SCHOUBBEN *et al.*, 2006). Adicionalmente, o composto bioativo, quando em meios aquosos (característicos de formulações cosméticas) e altas temperaturas, sofre o fenômeno de descarboxilação térmica, formando derivados de guaiacol (odor de cravo) e vanilina (odor de baunilha), entre outros produtos de degradação (FIDDLER *et al.*, 1967).

O fenômeno de descarboxilação térmica pode explicar os fenômenos ocorridos com as formulações contendo ácido ferúlico nas condições de estufa e temperatura ambiente, visto que, em geladeira, as amostras não apresentaram modificações, comparativamente à condição inicial ( $t_0$ ). Na **Figura 32** estão as duas principais rotas de degradação térmica do ácido ferúlico.

**Figura 32:** Rotas de degradação térmica do ácido ferúlico  
(adaptado de COGHE *et al.*, 2004; GRAF, 1992)

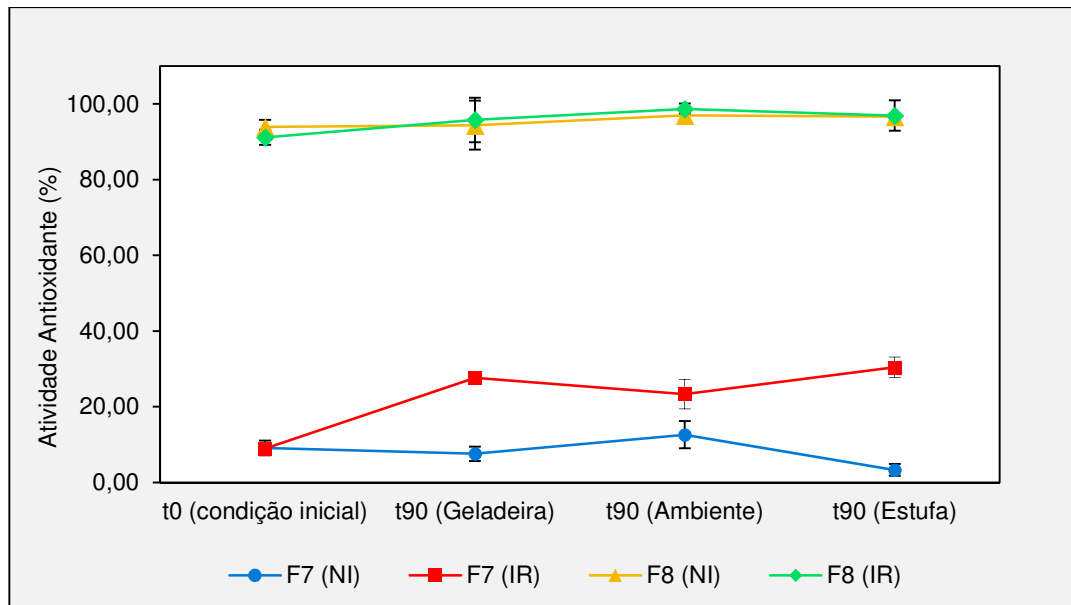


Adicionalmente, avaliando-se os resultados obtidos para a formulação **F7** (ausente do composto bioativo), não foram percebidas modificações em nenhuma das condições de armazenamento, comparativamente à condição inicial, confirmando que os fenômenos observados são provenientes da degradação do ácido ferúlico.

Com relação aos valores de pH e à viscosidade aparente, não foram observadas alterações significativas entre as formulações ou condições de armazenamento, com manutenção dos parâmetros observados na condição inicial, mesmo após as reações de degradação ocorridas para a formulação **F8**.

Após caracterização física e físico-química, as formulações submetidas ao estudo de estabilidade também foram avaliadas com relação à atividade antioxidante, ao valor de FPS estimado e ao comprimento de onda crítico. Os resultados são apresentados nas **Figuras 33, 34 e 35**, respectivamente.

**Figura 33:** Atividade antioxidante (%) das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias



**Legenda:** NI = amostra não irradiada; IR = amostra irradiada; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; AF = ácido ferúlico. Composição das formulações fotoprotetoras: **F7** = OT+BT; **F8** = OT+BT+AF

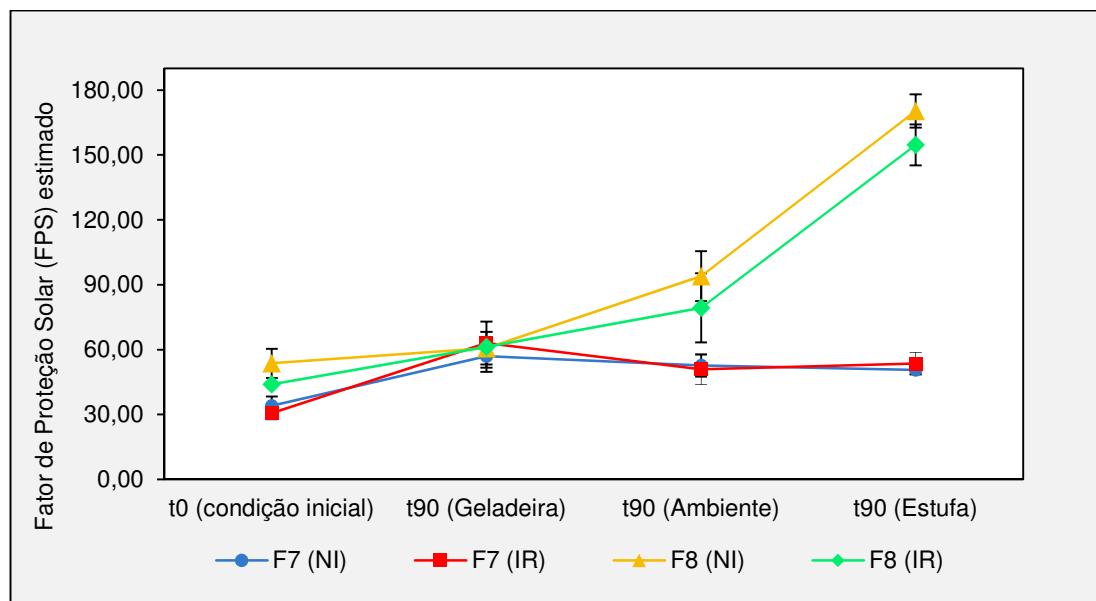
Considerando a formulação **F8**, os resultados de atividade antioxidante não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ), independentemente do tempo ou condição de armazenamento. Ainda que a formulação **F8** tenha apresentado degradação nas condições ambiente e estufa, os resultados de atividade antioxidante foram mantidos, visto que os principais produtos de degradação formados pela descarboxilação térmica do ácido ferúlico (**Figura 32**) apresentaram, assim como o composto bioativo,

grupamento hidroxila ligado ao anel benzênico, com capacidade doadora de elétrons e neutralizadora de EROs (GRAF, 1992).

Por outro lado, observando-se os resultados obtidos para a formulação **F7**, percebeu-se diferença estatisticamente significativa após a irradiação UV artificial das amostras, com aumento de sua atividade antioxidante ( $p < 0,05$ ). Considerando que este fenômeno ocorreu independente da condição de armazenamento, foi permitido constatar que um produto de degradação fotoinstável foi formado durante o envelhecimento da amostra e, após a etapa de irradiação, promoveu o aumento na atividade antioxidante das formulações.

Avaliando-se os resultados obtidos no estudo de fotoestabilidade (*item 5.5.3.*), no qual a octil triazona provocou aumento na atividade antioxidante da formulação **F3** após a etapa de irradiação, é permitido inferir que este filtro foi, provavelmente, o precursor do produto de degradação responsável pelo aumento da atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras.

**Figura 34:** Valor de FPS estimado das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias



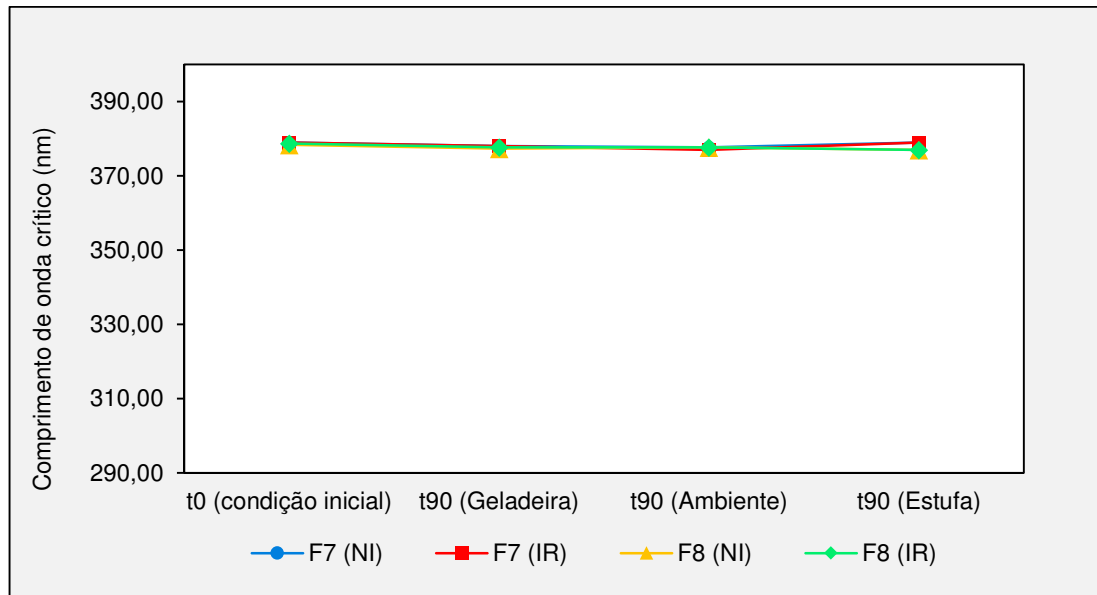
**Legenda:** NI = amostra não irradiada; IR = amostra irradiada; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; AF = ácido ferúlico. Composição das formulações fotoprotetoras: **F7** = OT+BT; **F8** = OT+BT+AF

Com relação aos valores de FPS estimado, a **Figura 34** ilustra que os resultados obtidos para a formulação **F7**, irradiadas ou não, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados à condição inicial ( $t_0$ ), independente da condição de armazenamento. Assim como o observado para os resultados de atividade antioxidante, este fato pode ser explicado pela possível formação do produto de degradação proveniente da octil triazona durante o envelhecimento da amostra, responsável por promover não apenas o aumento dos valores de FPS *in vitro*, mas também o acréscimo do potencial antioxidante das formulações.

Avaliando-se os resultados referentes à formulação **F8**, também se observaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), em especial para as formulações armazenadas em estufa e temperatura ambiente. Estes dados podem ser explicados tanto pela teoria de formação de um produto de degradação proveniente da octil triazona, quanto pela descarboxilação térmica do ácido ferúlico, que origina derivados fenólicos com propriedades fotoprotetoras, devido às suas estruturas em ressonância e sua capacidade de doação e recepção de elétrons, característicos dos filtros solares (GRAF, 1992).

Estes dois efeitos, atuando de forma sinérgica, podem explicar o aumento expressivo dos valores de FPS observados para a formulação **F8**, em especial quando comparados aos obtidos pela formulação **F7**.

**Figura 35:** Comprimento de onda crítico das formulações fotoprotetoras submetidas ao estudo de estabilidade de 90 dias



**Legenda:** NI = amostra não irradiada; IR = amostra irradiada; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; AF = ácido ferúlico. Composição das formulações fotoprotetoras: F7 = OT+BT; F8 = OT+BT+AF

Avaliando-se os resultados de comprimento de onda crítico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras em estudo, independentemente do tempo, condição de armazenamento irradiação UV artificial. Este fato pode ser explicado devido à presença do filtro bemotrizinol, molécula estável, fotoestável e com elevada proteção UVA (KOCKLER *et al.*, 2012; TUCHINDA *et al.*, 2006).

Em suma, considerando-se os resultados obtidos no estudo de estabilidade, constatou-se que as formulações fotoprotetoras multifuncionais, ainda que tenham apresentado degradação na presença do ácido ferúlico, mantiveram eficácia fotoprotetora e atividade antioxidante.

O armazenamento em geladeira se apresentou como a melhor condição para as amostras, por evitar a degradação térmica do ácido ferúlico; no entanto, o uso comum das formulações – normalmente expostas a temperaturas elevadas – requer cuidado especial com relação à seleção do material de acondicionamento, visando elevar o tempo de vida útil da formulação fotoprotetora, especialmente em condições ambientais adversas (luminosidade, umidade e temperatura, por exemplo).

Adicionalmente, diversos estudos indicaram a dificuldade de estabilização de antioxidantes de origem natural em formulações cosméticas ou farmacêuticas (FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000). Desta forma, visando proteger o ácido ferúlico contra reações de oxidação e degradação, algumas alternativas podem ser adotadas, como a incorporação do composto bioativo à ciclodextrinas ou nanoestruturas, bem como a adição de antioxidantes de origem sintética às formulações, de forma a aumentar a sua estabilidade/fotoestabilidade para fins de registro e comercialização (MONTI *et al.*, 2011; ANSELMINI *et al.*, 2008).

### 5.7. Ensaio de segurança das formulações

Os estudos de segurança por compatibilidade representam o primeiro contato do produto acabado em seres humanos e têm por objetivo comprovar a segurança pré-determinada por dados pré-clínicos e minimizar os riscos de reações adversas. Com esses estudos, é possível avaliar mecanismos irritativos e/ou alergênicos de um produto na população estudada, oferecendo aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco (BRASIL, 2012a).

Os componentes das formulações de melhor desempenho (**F7** e **F8**) foram analisados, por meio da literatura científica e regulatória, com relação ao seu potencial de risco, sendo considerados aprovados para o uso proposto (BRASIL, 2012a). Posteriormente, a segurança *in vivo* das formulações foi avaliada por meio dos testes clínicos de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica, além da avaliação microbiológica das amostras previamente à sua aplicação nos participantes do estudo.

As formulações foram avaliadas microbiologicamente, após inativação de seus conservantes, pelo método de semeadura em superfície descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Os resultados estão descritos na **Tabela 11** e evidenciaram a qualidade microbiológica das amostras, garantindo a segurança dos participantes durante a condução dos ensaios clínicos.



**Tabela 11:** Avaliação microbiológica das formulações em estudo

Análise microbiológica	Especificação para semissólidos	Formulação F7 (OT + BT)	Formulação F8 (OT + BT + AF)
Contagem total de bactérias aeróbias	< 100 UFC / g	N.D.	N.D.
Contagem total de fungos e leveduras	< 10 UFC / g	N.D.	N.D.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente em 1 g	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente em 1 g	Ausente	Ausente

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; N.D. = não detectado. Cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foram utilizadas como controles positivos e evidenciaram a capacidade de promoção de crescimento dos meios de cultura empregados nas análises microbiológicas.

Os ensaios clínicos foram iniciados após a comprovação de qualidade das formulações, em parceria com a empresa IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada. Os participantes foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, e apresentaram idade entre 18 e 60 anos e fototipo de pele entre II e IV, de acordo com a escala de Fitzpatrick. Durante os ensaios, os participantes foram acompanhados por médico dermatologista e avaliados com relação aos seguintes parâmetros: (i) sensações de desconforto sentidas durante ou após o estudo; e (ii) sinais clínicos apresentados, como eritema, edema e descamação, entre outros. Os resultados obtidos nos ensaios de segurança *in vivo* são apresentados na **Tabela 12** e foram avaliados de acordo com a escala de Draize para a formação de edemas e eritemas (DRAIZE; WOODWARD; CALVERY, 1944).

**Tabela 12:** Ensaios de segurança *in vivo* das formulações

Ensaio Clínico	Participantes avaliados	Escala de Draize (edemas e eritemas)	
		Formulação F7 (OT + BT)	Formulação F8 (OT + BT + AF)
Irritação cutânea primária e acumulada	55	Escala 0	Escala 0
Sensibilização dérmica	55	Escala 0	Escala 0
Fotoirritação cutânea	27	Escala 0	Escala 0
Fotossensibilização dérmica	27	Escala 0	Escala 0

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; **Escala de Draize 0:** ausência de edemas e eritemas em todos os participantes do estudo.

Os dados da **Tabela 12** comprovaram a segurança das formulações avaliadas, visto que as mesmas não provocaram reações adversas, sinais clínicos ou sensação de desconforto nos participantes, independente do estudo. Estes resultados corroboraram os dados de segurança *in vitro*, reportados na literatura, sobre a segurança dos filtros solares e composto bioativo utilizados, garantindo a sua segurança quando incorporados às formulações fotoprotetoras multifuncionais (KOCKLER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2005; MANCUSO; SANTANGELO, 2014; TUCHINDA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010).

A segurança comprovada das formulações, além de permitir a sua utilização posterior nos ensaios de caracterização funcional *ex vivo* e *in vivo*, também assegurou a qualidade das amostras para o consumidor final, fatores primordiais para a comercialização de um produto cosmético. Adicionalmente, considerando que as formulações **F7** e **F8** apresentaram as maiores concentrações de compostos ativos dentre todas as preparadas durante o presente estudo, foi possível extrapolar as suas características de segurança para as amostras avaliadas previamente (**F1** a **F6**) (BRASIL, 2012a).

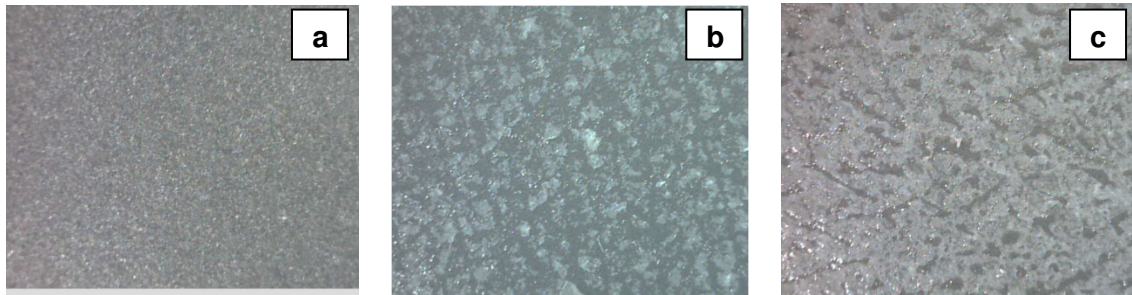
### 5.8. Caracterização funcional *ex vivo* das formulações

A caracterização funcional *ex vivo* foi realizada por meio da técnica de *tape stripping*, visando avaliar a atividade antioxidante da epiderme após tratamento com as formulações fotoprotetoras de melhor desempenho (**F7** e **F8**).

Foram selecionados 10 participantes, de acordo com os termos de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, com idade entre 19 e 44 anos e fototipo de pele entre II e V. As fitas adesivas foram pressionadas sobre as áreas de aplicação, com o auxílio de um aparato na forma de rolo, para favorecer a distribuição uniforme da pressão exercida sobre o local e permitir a remoção adequada do estrato córneo. Ademais, foi utilizado um estêncil para demarcar as áreas de aplicação, garantindo que a camada córnea fosse removida sempre do mesmo local (LADEMANN *et al.*, 2009). Durante os procedimentos, os participantes não relataram sensação de desconforto.

Sabendo-se que a técnica de *tape stripping* fornece informações não apenas sobre o potencial de penetração de substâncias aplicadas topicamente, mas, também, sobre a sua retenção nas distintas camadas da cutis, as 20 fitas removidas de cada área foram organizadas em dois grupos distintos: fitas 2 a 10 e fitas 11 a 20, visando avaliar a distribuição das formulações no estrato córneo. Adicionalmente, a primeira fita removida foi descartada, visto que esta representou o excesso de formulação na superfície da pele (DARLENSKI *et al.*, 2009). As microfotografias da primeira fita removida de cada área de aplicação são ilustradas na **Figura 36** e indicam, pela presença de corneócitos nas microfotografias **b** e **c**, além do excesso de formulação na microfotografia **c**, a bem-sucedida utilização da técnica de *tape stripping* na remoção das células mais superficiais da epiderme.

**Figura 36:** Microfotografias da primeira fita adesiva removida no ensaio de *tape stripping*, de acordo com a área de aplicação (aumento de 200 vezes)



**Legenda:** **a** = fita adesiva branca; **b** = fita adesiva após remoção da pele não tratada; **c** = fita adesiva após remoção da pele tratada com a formulação fotoprotetora **F8**.

A camada córnea removida pelas fitas foi extraída com metanol e, posteriormente, tratada com o radical livre DPPH, para avaliação da atividade antioxidante. Os resultados estão descritos na **Tabela 13**.

**Tabela 13:** Atividade antioxidante da epiderme, tratada ou não, com as formulações fotoprotetoras

Amostras	Irradiação das fitas	Fitas 2 a 10	Fitas 11 a 20
<b>Pele não tratada</b> (controle)	não irradiada	37,43 ± 9,61 <sup>A</sup>	37,90 ± 7,77 <sup>A</sup>
	Irradiada	30,72 ± 8,93 <sup>A</sup>	32,88 ± 7,41 <sup>A</sup>
<b>F7</b> (OT + BT)	não irradiada	38,20 ± 7,98 <sup>A</sup>	39,87 ± 10,44 <sup>A</sup>
	Irradiada	31,44 ± 6,84 <sup>A</sup>	34,50 ± 6,75 <sup>A</sup>
<b>F8</b> (OT + BT + AF)	não irradiada	43,07 ± 8,97 <sup>A</sup>	43,00 ± 6,43 <sup>A</sup>
	Irradiada	39,67 ± 7,86 <sup>A</sup>	35,92 ± 9,45 <sup>A</sup>

**Legenda:** **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **AF** = ácido ferúlico.

Resultados de atividade antioxidante da epiderme expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos (nível de significância = 0,05).

Apesar dos resultados terem, aparentemente, apresentado tendência ao aumento da atividade antioxidante da epiderme após o tratamento com a formulação contendo ácido ferúlico (**F8**), bem como tendência à queda da atividade antioxidante da epiderme após a exposição à radiação UV, em função dos valores de desvio padrão obtidos (característicos de estudos com seres humanos e à variabilidade genética inerente a cada participante), os resultados não geraram respostas estatisticamente distintas. Adicionalmente, avaliando-se a distribuição das formulações no estrato córneo (fitas 2 a 10 e fitas 11 a 20), não foram observadas diferenças significativas entre as profundidades de retenção avaliadas.

Os resultados de atividade antioxidante podem ser explicados devido ao baixo grau de penetração cutânea do ácido ferúlico, responsável por mantê-lo apenas na superfície da pele. Em dois estudos distintos, o potencial de permeação do composto bioativo foi avaliado, evidenciando que a bicamada lipídica representava a maior barreira para a sua penetração. Adicionalmente, os mesmos estudos concluíram, ao contrário do esperado, que o valor de pH do meio, fator determinante para o grau de ionização e consequente lipofilicidade do ácido ferúlico, não apresentou influência sob a sua permeação (SAIJA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2010).

Como estratégia para interferir na função barreira do estrato córneo e elevar a penetração do ácido ferúlico através da bicamada lipídica, Chen, Liu e Fahr (2010) avaliaram o emprego de lipossomas e etossomas. Os resultados confirmaram que os sistemas vesiculares aumentaram o potencial de permeação e retenção cutânea do ácido ferúlico, com destaque para os etossomas, que foram capazes de aumentar a permeação do composto bioativo em 75 vezes, comparativamente à sua forma livre.

Similarmente, Zhang e colaboradores (2010) avaliaram o potencial de permeação de um derivado éster do ácido ferúlico, o ferulato de etila, concluindo que a modificação estrutural do composto, ao aumentar a sua lipofilicidade, proporcionou aumento concomitante em sua permeação cutânea; no entanto, comparativamente ao ácido ferúlico, o ferulato de etila apresentou atividade antioxidante reduzida.

Em resumo, não foram observadas diferenças significativas na atividade antioxidante da epiderme, independente do tratamento (formulações ou controle) e do grupo de fitas, sugerindo, assim, reduzida permeação do composto bioativo. No

entanto, as tendências observadas, somadas às técnicas capazes de aumentar a penetração do ácido ferúlico através da pele, indicaram potencial de aplicação tópica e multifuncional desse composto, que apresentaria efeito fotoprotetor quando na superfície da pele (resultados apresentados a seguir), e potencial antioxidante, devido a interrupção da cadeia de radicais livres, quando absorvido.

### 5.9. Caracterização funcional *in vivo* das formulações

A caracterização funcional *in vivo* foi realizada por meio da avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção UVA (UVA-PF).

Para a avaliação do FPS *in vivo*, os participantes foram selecionados de acordo com os termos de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, apresentaram idade entre 18 e 60 anos e fototipo de pele entre II e III. O estudo envolveu 10 participantes e foi considerado estatisticamente válido, visto que o intervalo de confiança a 95% (IC95) das análises encontrou-se dentro da variação de  $\pm 17\%$  do FPS médio obtido para as formulações testes e para o padrão do estudo, conforme requerido pelas agências regulatórias (COSMETICS EUROPE, 2011). Os resultados de FPS *in vivo* das formulações de melhor desempenho estão descritos na **Tabela 14**.

**Tabela 14:** Fator de Proteção Solar (FPS) *in vivo* das formulações fotoprotetoras

Formulação (Composição)	Fator de Proteção Solar (FPS)	IC 95	% do IC 95 em relação à média (aprovado se < 17%)
<b>Formulação Padrão</b> (Padrão P2 Cosmetics Europe – FPS 15)	<b>15,9 ± 2,0</b>	1,41	8,84 (Aprovado)
<b>F7</b> (OT + BT)	<b>19,7 ± 2,9<sup>A</sup></b>	2,05	10,42 (Aprovado)
<b>F8</b> (OT + BT + AF)	<b>26,0 ± 1,6<sup>B</sup></b>	1,14	4,39 (Aprovado)

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol.

Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student para duas médias (nível de significância = 0,05), entre as formulações F7 e F8.

O fator de proteção UVA (UVA-PF) foi determinado *in vitro*, por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. O programa computacional acoplado ao equipamento (UV<sup>®</sup> 2000) foi utilizado na conversão dos dados de transmitância em resultados de UVA-PF, antes e após a etapa de irradiação. Adicionalmente, o programa UV<sup>®</sup> 2000 também foi utilizado para a obtenção dos demais dados necessários para o cálculo do UVA-PF, entre eles o coeficiente de ajuste (C) entre os valores de FPS *in vivo* e *in vitro* (que deve apresentar valor entre 0,8 e 1,2 para que os resultados sejam considerados estatisticamente válidos) e a dose de irradiação empregada para cada uma das formulações (COSMETICS EUROPE, 2011). Os resultados de UVA-PF das formulações de melhor desempenho podem ser encontrados na **Tabela 15**.

**Tabela 15:** Fator de Proteção UVA (UVA-PF) das formulações fotoprotetoras

Formulação (Composição)	Coeficiente de Ajuste (C)	UVA-PF <sub>0</sub>	Dose (J/cm <sup>2</sup> )	UVA-PF
<b>F7</b> (OT + BT)	0,8 ± 0,0	12,3 ± 0,6	14,8 ± 1,1	<b>11,3 ± 0,6<sup>A</sup></b>
<b>F8</b> (OT + BT + AF)	0,9 ± 0,1	16,3 ± 0,6	19,6 ± 0,4	<b>14,0 ± 0,0<sup>B</sup></b>

**Legenda:** AF = ácido ferúlico; OT = octil triazona; BT = bemotrizinol; UVA-PF<sub>0</sub> = fator de proteção UVA pré-irradiação; UVA-PF = fator de proteção UVA pós-irradiação.

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os resultados paramétricos foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student para duas médias (nível de significância = 0,05), entre as formulações F7 e F8.

As duas formulações avaliadas foram consideradas de amplo espectro de proteção, visto que apresentaram valores de FPS *in vivo* acima de 15, valores de UVA-PF acima de 1/3 do valor de FPS, e comprimento de onda crítico acima de 370 nm, atendendo aos requisitos para o registro de formulações fotoprotetoras (BRASIL, 2012b; COSMETICS EUROPE, 2006; 2011).

Os dados de eficácia fotoprotetora podem ser explicados não apenas pela ampla proteção fornecida pelos filtros solares empregados, mas, em especial, pelas características antioxidante e protetora contra eritemas do ácido ferúlico

(SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007). Os resultados obtidos para a formulação **F8** comprovaram o potencial fotoprotetor do composto bioativo quando em sinergismo com os filtros solares, visto que a sua presença promoveu aumento de 32% no valor de FPS *in vivo* e 24% no valor de UVA-PF, ambos estatisticamente significativos. Ademais, o aumento no valor de UVA-PF fornecido pelo ácido ferúlico representou resultado expressivo, já que dados da literatura reportam a sua eficácia fotoprotetora apenas contra a radiação UVB (SAIJA *et al.*, 2000).

Em análise comparativa dos valores de FPS *in vitro* e *in vivo*, ainda que o coeficiente de ajuste (C) tenha apresentado valores dentro da faixa de aprovação para o estudo, observou-se discrepância entre os resultados: a formulação **F7** apresentou redução de 42% no resultado de FPS *in vivo*, comparativamente ao obtido *in vitro*; da mesma forma, a formulação **F8** apresentou diminuição de 51% em análise comparativa. Esta discrepância pode ser explicada pelas características das formulações fotoprotetoras e pelas limitações da técnica *in vitro* para o cálculo de FPS.

De acordo com Bendová e colaboradores (2007), os substratos empregados nos ensaios *in vitro* são incapazes de mimetizar de forma perfeita a superfície da pele humana, fator que influencia os resultados obtidos; da mesma forma, a aplicação homogênea e uniforme nos substratos também pode ser dificultada pelas características das formulações. Em estudo de Sheu e colaboradores (2003), foi evidenciado que preparações com características oleosas ou com altos valores de FPS (como é o caso das formulações em estudo) interferem na uniformidade de aplicação sobre os substratos, provocando variações maiores entre os dados obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Outro fator com influência comprovada na correlação entre o FPS *in vitro* e *in vivo* é a taxa de aplicação das formulações nos substratos empregados *in vitro*. Em estudo de Garoli e colaboradores (2008), a correlação entre o FPS *in vivo* e *in vitro* foi maior para taxas de aplicação *in vitro* menores, da ordem de 0,65 mg/cm<sup>2</sup>; no entanto, a correlação obtida não foi exata, impedindo a aprovação dos testes *in vitro*. Este resultado justifica a discrepância entre os valores de FPS *in vivo* e *in vitro* obtidos no presente estudo, visto que a taxa de aplicação empregada (1,3 mg/cm<sup>2</sup>), ainda que recomendada pelas agências regulatórias europeias e brasileiras para o cálculo do UVA-PF, pode ter sido muito elevada para a obtenção de um índice de correlação adequado.



Enfim, os resultados de eficácia funcional *in vivo* comprovaram o potencial fotoprotetor e, conseqüentemente, a permeação cutânea reduzida do ácido ferúlico, visto que o composto bioativo não absorvido e presente na superfície da epiderme apresentou papel relevante na proteção contra a radiação UV. Adicionalmente, ainda que os resultados de FPS *in vitro* não possam ser correlacionados com os obtidos *in vivo* – fato que impede a validação da metodologia – ressalta-se a importância das análises *in vitro* como método de triagem na pesquisa e desenvolvimento de formulações fotoprotetoras, representando modo rápido, seguro e de baixo custo para reduzir o número de experimentos *in vivo*, minimizando a exposição de voluntários à radiação UV (BENDOVÁ *et al.*, 2007).

*Conclusões*

---

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados e condições experimentais adotadas, as seguintes conclusões são apresentadas:

- *Atividade antioxidante do ácido ferúlico*

As soluções metanólicas de ácido ferúlico apresentaram atividade antioxidante acima de 90% para todas as concentrações testadas (0,1 a 1,0% p/p). Adicionalmente, comprovou-se que a alcalinidade do meio foi diretamente relacionada à redução do potencial antioxidante do composto bioativo.

- *Desenvolvimento das formulações multifuncionais*

As oito emulsões desenvolvidas se apresentaram macroscopicamente estáveis, com valor de pH biocompatível com a pele (6,5 a 7,1) e viscosidade aparente acima de 36.000 cP. As emulsões exibiram características organolépticas adequadas ao uso proposto, se mantendo estáveis durante o Estudo de Estabilidade Preliminar.

- *Delineamento Experimental (Caracterização funcional in vitro)*

A análise do delineamento experimental com relação aos resultados de atividade antioxidante e eficácia fotoprotetora evidenciou o efeito sinérgico da combinação entre os filtros solares e o ácido ferúlico.

Com relação à atividade antioxidante *in vitro*, o ácido ferúlico apresentou a maior influência sobre os resultados obtidos, fornecendo aumento da ordem de 90% no potencial antioxidante das formulações.

Considerando a eficácia fotoprotetora *in vitro*, os principais efeitos foram proporcionados pelos filtros octil triazona e bemotrizinol, sendo o último responsável pela absorção de amplo espectro: valores de FPS estimado acima de 15 e comprimento de onda crítico acima de 370 nm. Contudo, o ácido ferúlico apresentou influência significativa nos resultados de eficácia fotoprotetora, tanto isoladamente, quanto em associação com os filtros solares,

promovendo aumento de até 58% nos valores de FPS estimado (formulação **F8**) e até 7,0 nm no comprimento de onda crítico (formulação **F4**) das formulações multifuncionais.

- *Fotoestabilidade*

As formulações apresentaram, em sua maioria, perfil fotoestável após exposição à radiação UV artificial, com manutenção da sua eficácia antioxidante e fotoprotetora. No entanto, este efeito não foi devido ao ácido ferúlico, mas sim aos filtros solares octil triazona e bemotrizinol.

- *Estudo de Estabilidade*

A formulação contendo ácido ferúlico (**F8**) apresentou degradação por descarboxilação térmica nas condições de estufa e temperatura ambiente, característica não observada em geladeira ou para a formulação ausente do composto bioativo (**F7**). No entanto, a degradação das formulações não influenciou os resultados de eficácia funcional *in vitro* (atividade antioxidante e eficácia fotoprotetora).

- *Ensaio de Segurança in vivo*

As formulações de melhor desempenho (**F7** e **F8**) foram aprovadas nos ensaios *in vivo* de irritação cutânea primária e acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação cutânea e fotossensibilização dérmica. A aplicação das formulações *in vivo* não provocou reações adversas, sinais clínicos ou sensação de desconforto nos participantes do estudo, independente do ensaio realizado.

- *Atividade antioxidante ex vivo*

A porcentagem de atividade antioxidante da epiderme, avaliada pelo método de *tape stripping ex vivo*, variou entre 30,72 e 43,07%, sendo os maiores valores obtidos para a formulação **F8**, contendo ácido ferúlico, e os menores valores obtidos para a pele não tratada após irradiação UV artificial. No entanto,

devido aos valores de desvio padrão, característicos de amostras biológicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ou tratamentos avaliados.

- *Eficácia fotoprotetora in vivo*

A formulação **F8**, contendo ácido ferúlico, apresentou aumento de 32% no valor de FPS *in vivo* e 24% no valor de UVA-PF, comparativamente à formulação **F7**, ausente do composto bioativo. Ainda, as duas formulações foram consideradas de amplo espectro de proteção, visto que apresentaram valores de FPS *in vivo* acima de 15 e valores de UVA-PF acima de 1/3 do valor de FPS *in vivo*.

A comparação dos valores de FPS *in vitro* e *in vivo*, indicaram redução de até 50% nos valores de FPS *in vivo*, inviabilizando a correlação entre os dois métodos.

Em suma, os resultados gerais evidenciaram o efeito sinérgico do ácido ferúlico quando associado aos filtros solares octil triazona e bemotrizinol, comprovando o potencial de aplicação do composto bioativo em formulações multifuncionais com eficácia fotoprotetora e antioxidante. Tal perfil de resposta, inclusive, garante o desenvolvimento de formulações mais competitivas e seguras, pois permite a substituição de filtros solares tradicionais por compostos de origem natural, com manutenção da eficácia fotoprotetora.

## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS <sup>1</sup>

ALONSO, C.; BARBA, C.; RUBIO, L.; SCOTT, S.; KILIMNIK, A.; CODERCH, L.; NOTARIO, J.; PARRA, J. L. An *ex vivo* methodology to assess the lipid peroxidation in stratum corneum. *J Photoch Photobio B*, v. 97, p. 71-76, 2009.

ANDREASSI, M. Sunscreens and photoprotection. *Expert Rev Dermatol*, v. 6, n. 5, p. 433-435, 2011.

ANSEMI, C.; CENTINI, M.; MAGGIORE, M.; GAGGELLI, N.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; BERETTA, G.; FACINO, R. M. Non-covalent inclusion of ferulic acid with  $\alpha$ -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J Pharmaceut Biomed*, v. 46, n. 4, p. 645-652, 2008.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photoch Photobio B*, v. 63, p. 8-18, 2001.

BENDOVÁ, H.; AKRMAN, J.; KREJČÍ, A.; KUBÁČ, L.; JÍROVÁ, D.; KEJLOVÁ, K.; KOLÁŘOVÁ, H.; BRABEC, M.; MALÝ, M. *In vitro* approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicol In Vitro*, v. 21, p. 1268-1275, 2007.

BENFELDT, E.; HANSEN, S. H.; VOLUND, A.; MENNÉ, T.; SHAH, V. P. Bioequivalence of topical formulations in humans: evaluation by dermal microdialysis sampling and the dermatopharmacokinetic method. *J Invest Dermatol*, v. 127, n. 1, p. 170-178, 2007.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. *Statistics for experiments. Design, innovation and discovery*. 2. ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. 639 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, L. A. *Index ABC: ingredientes para a indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 1460 p.

<sup>1</sup> De acordo com a NBR 6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira 5ª Ed.* Brasília, 2010, v.1, 546p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.* Brasília, 2012a, v.2, 72p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 47*, de 16 de março de 2006. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 30*, de 1º de junho de 2012b. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

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

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review in antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, v. 51, p. 15-25, 2013.

CESTARI, T. F.; OLIVEIRA, F. B.; BOZA, J. C. Considerations on photoprotection and skin disorders. *Ann Dermatol Vener*, v. 139, p. S135-S143, 2012.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol*, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHEN, M.; LIU, X.; FAHR, A. Skin delivery of ferulic acid from different vesicular systems. *J Biomed Nanotech*, v. 6, n. 5, p. 577-585, 2010.



CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Flavonoids and polyphenols, molecular families with sunscreen potential: determining effectiveness with an *in vitro* method. *Nat Prod Commun*, v. 4, n. 2, p. 227-230, 2009.

COGHE, S.; BENOOT, K.; DELVAUX, F.; VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F. R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indication of feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agr Food Chem*, v. 52, p. 602-608, 2004.

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

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

COSMETICS EUROPE. *In vitro method for the determination of the UVA protection factor and "critical wavelength" values of sunscreen products*. Brussels, 2011, 28 p.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-filter combinations under UV-A exposure: concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. *J Photoch Photobio B*. v. 87, n. 2, p.95-104, 2007.

DARLENSKI, R.; SASSNING, S.; TSANKOV, N.; FLUHR, J. W. Non-invasive *in vivo* methods of investigation of the skin barrier physical chemical properties. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 72, n. 2, p.295-303, 2009.

DRAIZE, J.H.; WOODWARD, D.G.; CALVERY, H.O. Methods for study of irritation and toxicity substances applied to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 82, p.377-390, 1944.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J Am Acad Dermatol*, v. 43, n. 6, p.1024-1035, 2000.

ERDEMGIL, F. Z.; SANLI, S.; SANLI, N.; ÖZKAN, G.; BARBOSA, J.; GUITERAS, J.; BELTRÁN, J. L. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, v. 72, p. 489-496, 2007.

FIDDLER, W.; PARKER, W. E.; WASSERMAN, A. E.; DOERR, R. C. Thermal decomposition of ferulic acid. *J Agr Food Chem*, v. 15, n. 5, p. 757-761, 1967.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M. A.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol*, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agr Food Chem*, v. 48, p. 2101-2110, 2000.

GAROLI, D.; PELIZZO, M. G.; BERNARDINI, B.; NICOLOSI, P.; ALAIBAC, M. Sunscreens tests: correspondence between *in vitro* data and values reported by the manufacturers. *J Dermatol Sci*, v. 52, p. 193-204, 2008.

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

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Bio Med*, v. 13, p. 435-448, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 704 p.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma? *J Invest Dermatol*, v. 121, n. 4, p. 862-868, 2003.

HÖNIGSMANN, H. Erythema and pigmentation. *Photodermatol Photo*, v. 18, p. 75-81, 2002.

JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; LIM, H. W. Photoprotection. Part II. Sunscreen: development, efficacy and controversies. *J Am Acad Dermatol*, v. 69, n. 6, p. 867.e1-e14, 2013a.

JANSEN, R.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; OSTERWALDER, U.; LIM, H. W. Photoprotection. Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*, v. 69, n. 6, p. 853.e1-e12, 2013b.

JAPAN. Japan Cosmetic Industry Association. Technical Bulletin. *Measurement standards for UVA protection efficacy*. Tokyo, 1995-1996, 17 p.

KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. *J Photochem Photobiol C*, v. 13, p. 91-110, 2012.

LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C.; WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J.W. The *tape stripping* procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 72, n. 2, p. 317-323, 2009.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. *Lancet*, v. 370, p. 528-537, 2007.

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

LIN, F. H.; LIN, J. Y.; GUPTA, R. D.; TOURNAS, J. A.; BURCH, J. A.; SELIM, M. A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GRICHNIK, J. M.; ZIELINSKI, J.; PINNELL, S. R. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *J Invest Dermatol*, v. 125, n. 4, p. 826-832, 2005.

MC NAMEE, P. M.; API, A. M.; BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; GILPIN, D. A.; HALL, B.M.; JOWSEY, I.; ROBINSON, M. K. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Regul Toxicol Pharm*, v. 52, p. 24-34, 2008.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*, v. 65, p. 185-195, 2014.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTGOMERY, D.C. *Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade*. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2004. 532 p.

MONTI, D.; TAMPUCCI, S.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SAINO, V.; CENTINI, M.; STALTARI, L.; ANSELMINI, C. Permeation and distribution of ferulic acid and its  $\alpha$ -cyclodextrin complex from different formulations in hairless rat skin. *AAPS Pharm SciTech*, v. 12, n. 2, p. 514-520, 2011.

ORESAJO, C.; STEPHENS, T.; HINO, P. D.; LAW, R. M.; YATSKAYER, M.; FOLTIS, P.; PILLAI, S.; PINNELL, S. R. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *J Cosmet Dermatol*, v. 7, p. 290-297, 2008.

OU, S.; KWOK, K. C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci Food Agr*, v. 84, p. 1261-1269, 2004.

OU-YANG, H.; STANFIELD, J.; COLE, C.; APPA, Y.; RIGEL, D. High-SPF sunscreens (SPF  $\geq$  70) may provide ultraviolet protection above minimal recommended levels by adequately compensating for lower sunscreen user application amounts. *J Am Acad Dermatol*, v. 67, n. 6, p. 1220-1227, 2012.

OZCELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D.B. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Food Chem Toxicol*, v. 68, n. 2, p. 487-490, 2003.

PAIVA, L. B.; GOLDBECK, R.; SANTOS, W. D.; SQUINA, F. M. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Braz J Pharm Sci*, v. 49, n. 3, p. 395-411, 2013.

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

RAVENEL, N. Pemulen® TR-2: an emulsifying agent with promise. *WACC Newsletter*, v. 32, n. 3, p. 10-12, 2010.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Curr Med Chem*, v. 20, p. 4436-4450, 2013.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm*, v. 199, p. 39-47, 2000.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: an overview and update. *J Am Acad Dermatol*, v. 64, n. 4, p. 748-758, 2011.

SARRUF, F. D.; PERES, D. A.; NISHIKAWA, D. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Assessment of *in vitro* Sun Protection Factor (SPF) and rheological profile of commercial infant sunscreens. *Rev Cienc Farm Basica Apl*, v. 34, n. 1, p. 33-36, 2013.

SCHOUBBEN, A.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; NOCCHETTI, M.; RICCI, M.; PERIOLI, L.; ROSSI, C. Evaluation and optimization of the conditions for an improved ferulic acid intercalation into a synthetic lamellar anionic clay. *Pharmaceut Res*, v. 23, n. 3, p. 604-613, 2006.

SEPPIC. *Polymers range*. Paris, 2011, 4 p.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. *Photochem Photobiol Sci*, v. 9, p. 464-469, 2010.

SHAH, V. P.; GLYNN, G. L.; YACOBI, Y. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – method of evaluation of bioequivalence. *Pharmaceut Res*, v. 15, n. 2, p. 167-171, 1998.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHEU, M. T.; LIN, C. W.; HUANG, M. C.; SHEN, C. H.; HO, H.O. Correlation of *in vivo* and *in vitro* measurements of Sun Protection Factor. *J Food Drug Anal*, v. 11, n. 2, p. 128-132, 2003.

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

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr*, v. 40, p. 92-100, 2007.

STANIFORTH, V.; HUANG, W. C.; ARAVINDARAM, K.; YANG, N. S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *J Nutr Biochem*, v. 23, p. 443-451, 2012.

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

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, E. M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 1-11, 2013.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. *Dermatol Clin*, v. 24, p. 105-117, 2006.

ULLAH, M. F.; KHAN, M. W. Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant-derived polyphenolic compounds. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 9, p. 187-196, 2008.

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

URBANIAK, A.; SZELAG, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Comput Theor Chem*, v. 1012, p. 33-40, 2013.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatol Ther*, v. 23, p. 31-47, 2010.

ZHANG, L. W.; AL-SUWAYEH, S. A.; HSIEH, P. W.; FANG, J. Y. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: evaluation of their efficacy and safety. *Int J Pharm*, v. 399, p. 44-51, 2010.

*Anexos*

---



## ANEXOS

### Anexo A: Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado e Doutorado



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Secretaria de Pós-Graduação

#### **Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
  - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
  - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
  - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esdarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
Presidente da CPG/FCF/USP

## Anexo B: Currículo Lattes – Daniela D’Almeida Peres

**Daniela D Almeida Peres**Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9254332255433473>

Última atualização do currículo em 24/06/2015

## Resumo informado pelo autor


Possui graduação em Farmácia pela Universidade de São Paulo (2010). Atualmente é pesquisadora do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cosméticos da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Fármacos e Medicamentos (Farmacotécnica e Desenvolvimento de Produtos Cosméticos e Farmacêuticos), Fotoproteção e Estatística aplicada às Ciências Farmacêuticas.

(Texto informado pelo autor)

## Dados pessoais

**Nome** Daniela D Almeida Peres  
**Nascimento** 21/08/1985 - São Paulo/SP - Brasil  
**CPF** 229.599.818-20

## Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
 Título: Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo  
 Orientador: André Rolim Baby   
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2010** Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
 Título: Análise e gerenciamento de risco no processo de revestimento polimérico não funcional de formas farmacêuticas sólidas  
 Orientador: Prof. Dra. Cristina Northfleet de Albuquerque

## Formação complementar

- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. United States Pharmacopeia, USP, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Writing in the Sciences. Stanford University, STANFORD, Stanford, Estados Unidos
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Viscosidade e Reologia. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Workshop de Capacitação para Pesquisadores da USP. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Bioestatística. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Análise Sensorial. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Validação de Processos. Yague Assesores, YUGUE, Brasil

## Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo  
institucional

**2011 - Atual** Vínculo: Aluna de Doutorado , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

## Atividades

**02/2012 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia

*Linhas de pesquisa:*  
 Fotoproteção bioativa - Fotoestabilidade - Atividade Antioxidante

2. Daiichi Sankyo Brasil Farmacêutica Ltda - DSBR

Vínculo  
institucional

**2010 - 2011** Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Analista de Validação de Processos e Limpeza ,

Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

**2008 - 2010** Vínculo: Celetista formal, Enquadramento funcional: Estagiária de P&D e Tecnologia Farmacêutica, Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva

3. Bioiab Sanus Farmacêutica - BIOLAB

#### Vínculo institucional

**2015 - Atual** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Farmacotécnico - PD&I Galênico, Carga horária: 40, Regime: Integral

#### Linhas de pesquisa

1. Fotoproteção bioativa - Fotoestabilidade - Atividade Antioxidante

#### Projetos

#### Projetos de pesquisa

- 2013 - Atual** Aplicação do ácido ferúlico em preparações fotoprotetoras multifuncionais: desenvolvimento, propriedade fotoestabilizadora e eficácia em modelo in vivo
- Descrição: A proposta do projeto envolve o caráter inovador do uso do AF como agente fotoestabilizador de sistemas fotoprotetores de amplo espectro, assim, protetores solares contendo-o serão desenvolvidos e avaliados quanto à atividade antioxidante, eficácia fotoprotetora (in vitro e clínica) e fotoestabilidade pós-irradiação artificial, visando prospectar seu potencial fotoestabilizador e agregação de melhorias significativas na eficácia antissolar. A prospecção fotoestabilizadora do AF permitirá orientar seu uso racionalmente em diversas outras classes de produtos cosméticos, principalmente, aquelas que necessitam de eficiente proteção e manutenção da cor. Edital Universal 2013.
- Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
- Alunos envolvidos: Doutorado (1);
- Integrantes: Daniela D Almeida Peres; BABY, A.R. (Responsável)
- Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq
- 2011 - 2011** Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física e físico-química de formulações tensoativas "não sulfatadas"
- Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
- Integrantes: Daniela D Almeida Peres; BABY, A.R. (Responsável); FARIA, A.B.
- Número de produções C,T & A: 1/
- 2011 - 2012** Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações antitranspirantes contendo óleo vegetal
- Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
- Integrantes: Daniela D Almeida Peres; BABY, A.R. (Responsável); Priscila Mirabile Barbosa
- Projeto de extensão**
- 2012 - Atual** Cosmético Social
- Descrição: Programa de inclusão para alunos do ensino público, nível médio. - Apresentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Apresentação das atividades desenvolvidas pelo Laboratório de Cosmetologia - Atividades teóricas e práticas sobre segurança em laboratório e desenvolvimento de produtos cosméticos
- Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão
- Integrantes: Daniela D Almeida Peres; BABY, A.R. (Responsável); VELASCO, M.V.R.; Camila Areias de Oliveira

## Revisor de periódico

1. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

#### Vínculo

**2014 - Atual** Regime: Parcial

## Produção

#### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. A.; RUGNO, C. M.; KOJIMA, M.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.*, v.148, p.154 - 159, 2015.
2. SILVA, D. G.; OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. A.; PEREIRA, N.; PEREIRA, M.; MOTA, J. P.; ROSADO, C.; LEITE-SILVA, V. R.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Impact of stirring speed, glycerin and sodium chloride concentrations on photoprotective nanoemulsions. *Biomedical and Biopharmaceutical Research.*, v.11, p.215 - 225, 2014.
3. SARRUF, F. D.; PERES, D. A.; NISHIKAWA, D. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Assessment of in vitro Sun Protection Factor (SPF) and rheological profile of commercial infant sunscreens. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.*, v.34, p.33 - 36, 2013.
4. NISHIKAWA, D. O.; PERES, D. A.; OLIVEIRA, C. A.; LEITE-SILVA, V. R.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin. *Biomedical and Biopharmaceutical Research.*, v.10, p.91 - 100, 2013.
5. FARIA, A. B.; PERES, D. A.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos 'não-sulfatados'. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.*, v.33, p.521 - 527, 2012.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, C. A., SILVA, A. L. F., PERES, D. A., FLORIDO, A., CHACRA, N. A. B., SARAIVA, N., MOTA, J. P., ROSADO, C., VELASCO, M.V.R., BABY, A.R.  
Rutin-loaded protein based nanotechnology: a platform for innovative sunscreens In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo.  
27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014.
2. PERES, D. A., OLIVEIRA, C. A., CONSIGLIERI, V.O., KANEKO, T.M., VELASCO, M.V.R., BABY, A.R.  
Synergistic effect of ferulic acid on Sun Protection Factor (SPF) and antioxidant activity of bioactive sunscreens In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014, São Paulo.  
Anais do 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014.
3. SARRUF, F.D., PERES, D. A., NISHIKAWA, D.O., CONSIGLIERI, V.O., KANEKO, T.M., VELASCO, M.V.R., BABY, A. R.  
In vitro solar protection factor (SPF) of commercial sunscreens by reflectance spectrophotometry. In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012, São Paulo.  
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012.
4. RIVELLI, D.P., SARRUF, F.D., PERES, D. A., BABY, A. R., BENTLEY, M.V.L.B., BARROS, S.B.M.  
Sun protection factor and cutaneous permeation of hydroethanolic extract of Ilex paraguariensis In: GPEN, 2012, Melbourne.  
GPEN - Globalization of Pharmaceutics Education Network, 2012. p.131 - 131

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PERES, D. A., BARBOSA, P.M., KANEKO, T.M., CONSIGLIERI, V.O., VELASCO, M.V.R., BABY, A.R.  
Hydrolyzed collagen interferes with in vitro photoprotective effectiveness of sunscreens In: 27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2014, Paris.  
27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2014.
2. PERES, D. A., OLIVEIRA, C. A., VELASCO, M.V.R., BABY, A.R.  
Synergistic effect of ferulic acid on SPF of BEMT / Ethylhexyl Triazone based sunscreens In: 27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2014, Paris.  
27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2014.
3. VELASCO, M.V.R., OLIVEIRA, C. A., PERES, D. A., RAMOS, M.M.A., CONSIGLIERI, V.O., KANEKO, T.M., BABY, A. R.  
Development and in vitro photoprotection efficacy of bioactive sunscreens containing rutin, avobenzone and octyl dimethyl paba. In: 27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2012, África do Sul.  
27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2012.
4. FARIA, A. B., PERES, D. A., PINTO, C.A.S.O., KANEKO, T.M., CONSIGLIERI, V.O., VELASCO, M.V.R., BABY, A. R.  
Development, physicochemical and chemical stability evaluation of "non-sulfated" surfactant formulations. In: 27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2012, África do Sul.  
27th International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Congress, 2012.

#### Produção técnica

##### Demais produções técnicas

1. PERES, D. A.  
Controle de Qualidade de Cosméticos, 2014. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
2. PERES, D. A.  
Farmácia Magistral - Cosmetologia, 2014. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
3. PERES, D. A.  
Análise Sensorial, 2013. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
4. PERES, D. A.  
Hidratação Cutânea, 2013. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
5. PERES, D. A.  
Estatística Básica, 2012. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
6. PERES, D. A.  
Fotoproteção - Aspectos Gerais das Preparações Solares, 2012. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
7. PERES, D. A.  
Veículos Farmacêuticos, 2012. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 25/06/2015 às 21:32:59.

## Anexo C: Ficha do aluno – Daniela D’Almeida Peres

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Documento sem validade oficial**

FICHA DO ALUNO

9139 - 5413094/1 - Daniela D’Almeida Peres

Email: daniela.peres@usp.br  
 Data de Nascimento: 21/08/1985  
 Cédula de Identidade: RG - 33.230.412-7 - SP  
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo  
 Nacionalidade: Brasileira  
 Graduação: Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -  
 Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado Direto  
 Programa: Fármaco e Medicamentos  
 Área: Produção e Controle Farmacêuticos  
 Data de Matrícula: 08/02/2012  
 Início da Contagem de Prazo: 08/02/2012  
 Data Limite para o Depósito: 08/02/2016  
 Orientador: Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 08/02/2012 até o presente. Email:  
 andrerb@usp.br  
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 08/02/2012  
 Data de Aprovação no Exame de  
 Qualificação: Aprovado em 29/04/2014  
 Data do Depósito do Trabalho:  
 Título do Trabalho:  
 Data Máxima para Aprovação da  
 Banca:  
 Data de Aprovação da Banca:  
 Data Máxima para Defesa:  
 Data da Defesa:  
 Resultado da Defesa:  
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 08/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2015

Impresso em: 21/08/2015 19:55:08



**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

**9139 - 5413094/1 - Daniela D'Almeida Peres**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5728-3/5	Aprimoramento Didático	06/03/2012	02/04/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5777-2/6	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	08/03/2012	21/06/2012	45	3	86	A	N	Concluída
EDM5102-2/7	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2012	23/04/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5710-7/2	Obtenção Racional de Insumos de Plantas Medicinais	09/04/2012	17/06/2012	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5805-1/1	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	100	A	N	Concluída
MAE5755-6/4	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	06/08/2012	25/11/2012	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5706-7/1	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	15/10/2012	10/12/2012	60	4	83	A	N	Concluída
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	90	A	N	Concluída
FBF5811-1/1	Utilização de Sistemas Biológicos In Vitro, Ex Vivo e In Vivo na Avaliação de Eficácia e Segurança de Fármacos, Medicamentos e Cosméticos	17/02/2014	30/03/2014	30	2	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
<b>Total:</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>30</b>

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2015

Impresso em: 21/06/2015 19:55:08

**Janus** - Sistema Administrativo de Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
**Documento sem validade oficial**

**FICHA DO ALUNO**

---

9139 - 5413094/1 - Daniela D'Almeida Peres

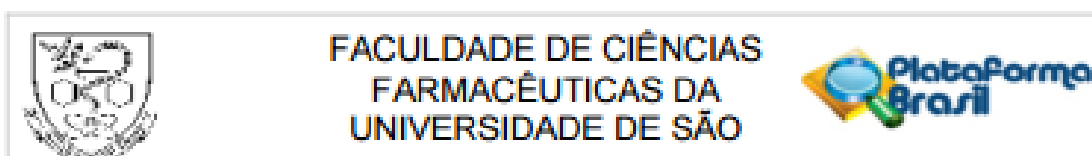
Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3755071	André Rolim Baby	FCF - USP	Presidente

---

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 02/02/2015

Impresso em: 21/06/2015 19:55:08

## Anexo D: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo

**Pesquisador:** André Rolim Baby

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31583814.0.0000.0067

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 738.493

**Data da Relatoria:** 25/08/2014

#### Apresentação do Projeto:

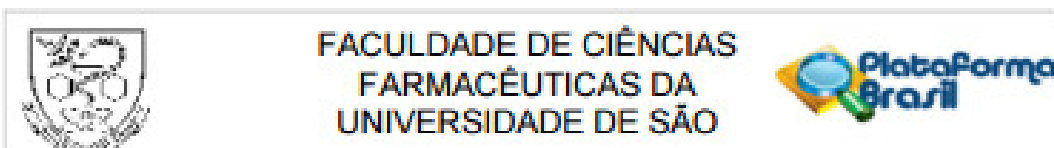
A proposta do projeto envolve a aplicação do ácido ferúlico no desenvolvimento de protetores solares multifuncionais, avaliando-se o potencial fotoprotetor e antioxidante das formulações, por meio de sólidas metodologias, com destaque para os ensaios de segurança in vivo, a avaliação in vitro e in vivo da eficácia fotoprotetora e a determinação do potencial antioxidante ex vivo da epiderme. Os resultados permitirão determinar o perfil promissor do AF no aumento da eficácia multifuncional de protetores solares, diminuindo a quantidade de filtros solares sintéticos atualmente empregados e contribuindo significativamente para o desenvolvimento e a comercialização de produtos inovadores e competitivos, com eficácia e segurança diferenciada frente aos efeitos nocivos promovidos pela exposição à radiação solar.

#### Objetivo da Pesquisa:

(i) desenvolvimento de quatro formulações fotoprotetoras contendo os compostos ativos e bioativo; (ii) determinação das características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras; (iii) avaliação da atividade antioxidante in vitro das formulações e do composto bioativo isolado; (iv) avaliação da eficácia fotoprotetora in vitro das formulações (FPS estimado e fator de proteção UVA), por meio da técnica de espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração; (v) avaliação da segurança das

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8686 E-mail: cepfci@usp.br





Continuação do Parecer: 735.493

formulações in vivo, por meio dos ensaios de irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização; (vi) avaliação do potencial antioxidante da epiderme (inibição da formação de radicais livres e da peroxidação lipídica) promovida pelos fotoprotetores, por meio da técnica de tape stripping ex vivo; e (vii) avaliação da eficácia fotoprotetora in vivo, por meio da determinação do fator de proteção solar (FPS).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** as substâncias que compõem os produtos em teste (4 formulações) são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Os pesquisadores e o médico dermatologista garantem os cuidados e o acompanhamento necessários durante todas as etapas do estudo.

**Benefícios:** não haverá nenhum benefício financeiro e à saúde, pois trata-se de um produto cosmético. No entanto, o participante da pesquisa estará ajudando a ampliar o conhecimento sobre a segurança e a eficácia de produtos cosméticos. As despesas decorrentes, exclusivamente da participação na pesquisa, serão completamente ressarcidas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é interessante e relevante diante do elevado número de produtos introduzidos no mercado, com promessa de atuar como antioxidantes, mas sem comprovação científica com metodologia de boa qualidade.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos foram adaptados de acordo com as pendências e recomendações apontadas pelo CEP.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112  
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8686 E-mail: cep@cf.usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 735.463

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

SAO PAULO, 01 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
**Maurício Yonamine**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 588, Bloco 13A, sala 112  
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8086 E-mail: cepfc@usp.br

**Anexo E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os ensaios de Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada e Sensibilização Dérmica**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE  
AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA  
E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA**

**1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)**

Nome: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade (número): \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefone (residencial): \_\_\_\_\_ Telefone (celular): \_\_\_\_\_

**2. Dados sobre a Pesquisa**

Título da Pesquisa: Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033  
 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Daniela D'Almeida Peres / fone: (11) 3091-2358 e (11) 98515-6263  
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4087-0092 e (11) 97030-2777  
 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas      Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o potencial irritante e/ou alergênico de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AValiação DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA**  
**E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA**

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dias pré-estabelecidos, durante cinco semanas. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo, contendo o(s) produto(s) em teste, em suas costas.

Após dois dias de contato do(s) produto(s) com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e leitura das áreas de suas costas expostas ao(s) produto(s), com avaliação de possíveis reações de irritação primária.

Durante as três semanas seguintes, a etapa de aplicação (descrita acima) será repetida em dias pré-estabelecidos, com reaplicação do(s) produto(s) sempre no mesmo local de suas costas, por meio da troca do adesivo. A sua pele será avaliada a cada etapa de aplicação, para avaliação de possíveis reações de irritação acumulada.

Após o período de aplicação de três semanas, haverá um período de repouso de, no mínimo, 10 dias, onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

Após o período de repouso de 10 dias, você retornará ao Instituto para aplicação de um novo adesivo contendo o(s) mesmo(s) produto(s) em teste, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos).

Finalmente, após dois dias de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e leitura das áreas de suas costas expostas ao produto, com avaliação de possíveis reações de sensibilização e/ou alergia.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AValiação DA IRRITaÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITaÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA**  
**E SENSIBILIZaÇÃO DÉRMICA**

Todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO CUTÂNEA PRIMÁRIA, IRRITAÇÃO CUTÂNEA ACUMULADA**  
**E SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA**

**Consentimento Pós-Esclarecido**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: [cepfci@usp.br](mailto:cepfci@usp.br).

## Anexo F: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os ensaios de Fotoirritação e Fotossensibilização Cutânea



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE AVALIAÇÃO DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

#### 1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade (número): \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefone (residencial): \_\_\_\_\_ Telefone (celular): \_\_\_\_\_

#### 2. Dados sobre a Pesquisa

Titulo da Pesquisa: Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033  
 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Daniela D'Almeida Peres / fone: (11) 3091-2358 e (11) 98515-6263  
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4087-0092 e (11) 97030-2777  
 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas      Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o potencial irritante e/ou alergênico de produtos cosméticos fotoprotetores, após exposição à fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AValiação DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dias pré-estabelecidos, durante cinco semanas. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica de sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo, contendo o(s) produto(s) em teste, em suas costas.

Após 24 horas de contato do(s) produto(s) com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A leitura das áreas de suas costas expostas ao(s) produto(s) será realizada 24 horas após a etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotoirritação primária.

Durante as três semanas seguintes, a etapa de aplicação e exposição à fonte de luz (descrita acima) será repetida em dias pré-estabelecidos, com reaplicação do(s) produto(s) sempre no mesmo local de suas costas, por meio da troca do adesivo. A sua pele será avaliada após cada etapa de exposição à fonte de luz, para avaliação de possíveis reações de fotoirritação acumulada.

Após o período de aplicação de três semanas, haverá um período de repouso de, no mínimo, 10 dias, onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

Após o período de repouso de 10 dias, você retornará ao Instituto para aplicação de um novo adesivo contendo o(s) mesmo(s) produto(s) em teste, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos).

Finalmente, após 24 horas de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A leitura das áreas de suas costas expostas ao(s) produto(s) será realizada 24 horas após a última etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotossensibilização.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.





**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AVALIAÇÃO DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

Todas as substâncias que compõem o produto uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AValiação DA FOTOIRRITAÇÃO E FOTOSENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

**Consentimento Pós-Esclarecido**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: [cepfcf@usp.br](mailto:cepfcf@usp.br).

## Anexo G: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o ensaio de Avaliação da Atividade Antioxidante da Pele



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE

#### 1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

Nome: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade (número): \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefone (residencial): \_\_\_\_\_ Telefone (celular): \_\_\_\_\_

#### 2. Dados sobre a Pesquisa

Titulo da Pesquisa: Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033  
 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Daniela D'Almeida Peres / fone: (11) 3091-2358 e (11) 98515-6263  
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4087-0092 e (11) 97030-2777  
 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 1 dia Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante da pele (responsável pela prevenção de danos cutâneos causados pelos radicais livres) após a aplicação de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE**

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao local da pesquisa em apenas um dia, permanecendo no local por um período de seis horas. Nesse dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele, com posterior aplicação do(s) produto(s) em teste em seu antebraço. Serão realizadas duas aplicações do(s) produto(s), sempre no mesmo local, com intervalos de duas horas entre cada aplicação.

Após duas horas da última aplicação, serão realizadas aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele nas áreas de aplicação do(s) produto(s) em teste, com desconforto mínimo.

Adicionalmente, uma área virgem do antebraço (não utilizada para a aplicação do(s) produto(s) em teste) será utilizada como controle do estudo, e também receberá aplicações sucessivas de fitas adesivas, com o objetivo de remover a camada superficial da pele.

Após esta etapa, você poderá deixar as dependências do local da pesquisa. Os adesivos removidos serão posteriormente avaliados, por pesquisadores treinados, para determinação da atividade antioxidante natural da pele (área controle) e também da atividade antioxidante da pele após tratamento com o(s) fotoprotetor(es) (áreas de aplicação).

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Todas as substâncias que compõem o produto são de uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PELE**

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

**Consentimento Pós-Esclarecido**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: [cepcf@usp.br](mailto:cepcf@usp.br).

**Anexo H: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o  
ensaio de Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS)**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE  
AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

**1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)**

Nome: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade (número): \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefone (residencial): \_\_\_\_\_ Telefone (celular): \_\_\_\_\_

**2. Dados sobre a Pesquisa**

Título da Pesquisa: Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*

Pesquisador Responsável: Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033  
 - Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Pesquisador Associado: Daniela D'Almeida Peres / fone: (11) 3091-2358 e (11) 98515-6263  
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 4087-0092 e (11) 97030-2777  
 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 2 dias                      Risco da Pesquisa: Mínimo

Faixa etária dos participantes da pesquisa: de 18 a 60 anos

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o Fator de Proteção Solar (FPS) de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**  
**AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dois dias consecutivos. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica de sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação do(s) produto(s) em teste em suas costas.

Após 20 minutos da aplicação, a área contendo o(s) produto(s) em teste será exposta a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. Adicionalmente, uma área virgem de suas costas (não utilizada para a aplicação do(s) produto(s) em teste) será utilizada como controle do estudo, e também será exposta à fonte emissora de luz, que reproduz a radiação solar.

No dia seguinte, você retornará ao Instituto de Pesquisa para que seja realizada a leitura das áreas de suas costas expostas à fonte de luz.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Todas as substâncias que compõem o produto são uso habitual e consideradas seguras para a finalidade que se destinam e na forma de aplicação proposta. No entanto, ainda que raras, ressaltamos que reações inesperadas, decorrentes da aplicação tópica do(s) produto(s) em teste, podem ocorrer, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica com intensidades variáveis, podendo ser graves.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235, Vila das Hortências, Jundiaí / SP, CEP: 13209-410, telefone: (11) 4087-0092 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70, Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

### AVALIAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

Você não obterá nenhum benefício financeiro e à sua saúde, pois este é um produto cosmético. No entanto, você estará ajudando, como participante desta pesquisa, a ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de produtos cosméticos. Garantimos que as suas despesas, decorrentes exclusivamente da participação nesta pesquisa, serão completamente ressarcidas.

Todas as informações obtidas e declaradas por você serão tratadas de maneira confidencial, sendo que apenas as pessoas diretamente ligadas a este estudo e autoridades legais poderão ter acesso, sem com isso, violar a confidencialidade. Se os resultados do estudo forem publicados, sua identidade continuará sendo preservada.

Você pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo, comunicando sua desistência ao pesquisador responsável pelo seu acompanhamento, sem que isso acarrete qualquer consequência negativa a você.

### Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

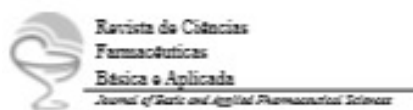
\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP: 05508-000, telefones (11) 3091-3622 e (11) 3091-3677, e-mail: [cepcf@usp.br](mailto:cepcf@usp.br).



## Anexo I: Artigos científicos e capítulos de livro publicados



Revista de Ciências  
Farmacéuticas  
Básica e Aplicada  
*Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*

Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., 2011;33(4):521-527  
ISSN 1908-4532

## Desenvolvimento e avaliação de produtos cosméticos para a higiene capilar contendo tensoativos “não-sulfatados”

Andréia Bonuzzi de Faria<sup>1</sup>; Daniela D’Almeida Peres<sup>1\*</sup>; Telma Mary Kaneko Vladi<sup>1</sup>; Olga Consiglieri<sup>1</sup>; Maria Valéria Robles Velasco<sup>1</sup>; André Rolim Baby<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

### RESUMO

Produtos cosméticos para a higiene capilar promovem a remoção de gordura, suor, poeira, células mortas, micro-organismos e resíduos de outros cosméticos do couro cabeludo e do cabelo. Com esta finalidade, foi proposto o desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo tensoativos primários não sulfatados associados separadamente com diferentes agentes de consistência (Myrj<sup>®</sup> 6000, Novethix<sup>™</sup> L-10 e Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 20). Dentre os seis tensoativos “não sulfatados” avaliados, dois foram selecionados (Plantapon<sup>®</sup> LGC Sorb e Sensactive<sup>®</sup> C30) conforme critérios de avaliação da viscosidade e da formação de espuma. Seis formulações foram desenvolvidas, com combinações distintas entre os tensoativos selecionados e os diferentes agentes de consistência (sem a adição intencional de cloreto de sódio), com posterior estudo de estabilidade em variadas condições de armazenamento. Durante os estudos de estabilidade acelerada, as formulações contendo os agentes de consistência Myrj<sup>®</sup> 6000 ou Novethix<sup>™</sup> L-10 não apresentaram estabilidade adequada. Ao final do estudo de estabilidade normal, as formulações remanescentes, contendo Carbopol<sup>®</sup> Ultrez 20, mantiveram as características organolépticas e desempenho adequado quanto à viscosidade, comprovando a eficiência deste polímero, mesmo em formulações com grandes quantidades de tensoativos “não sulfatados” e eletrólitos.

**Palavras-chave:** Tensoativos. Polímeros. Espessantes. Estabilidade.

### INTRODUÇÃO

A principal função dos xampus e sabonetes líquidos é promover a limpeza dos cabelos (couro cabeludo) e da

pele, respectivamente, por meio da eliminação de resíduos de material graxo, suor, poeira, células mortas, micro-organismos e resíduos cosméticos. Como todo produto cosmético, a formulação deve ser agradável no aspecto e aplicação, com viscosidade adequada, produzir espuma suficiente e não ser irritante para olhos e pele, entre outros (Prista & Nogueira, 1993).

Associado ao crescimento do mercado de tensoativos no Brasil, encontra-se o questionamento técnico, veiculado em diversos meios de comunicação, sobre as prováveis respostas orgânicas em relação à irritabilidade e carcinogenicidade dos tensoativos sulfatados e de subprodutos, especialmente o 1,4-dioxano, gerado por reações químicas ou contaminação (Biderman, 2010). Apesar do seu potencial irritante, segundo informes técnicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – (Brasil, 2010), e da *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (COLIPA, 2010), não existem evidências científicas que comprovem tal potencial carcinogênico devido ao uso desses tensoativos em produtos cosméticos.

Visando oferecer produtos seguros e eficazes aos consumidores, a Indústria Cosmética iniciou o desenvolvimento de xampus e sabonetes líquidos denominados “livres de sulfato”, substituindo os tensoativos sulfatados por outros com menor potencial irritante. Evidentemente, o uso de novas matérias-primas acarreta a necessidade de novos ensaios para a determinação de desempenho e estabilidade dos produtos no que concerne ao aspecto da formulação final, bem como a promoção da limpeza.

Para o desenvolvimento de novas formulações tensoativas para a higiene dos cabelos e do couro cabeludo, é de importância extrema a avaliação de alguns parâmetros físico-químicos, entre os quais se destacaram: o volume e estabilidade da espuma produzida, o valor de pH e a viscosidade, a fim de garantir a estabilidade do produto (Fox, 1989; Mainkar & Jolly, 2000).

Embora a viscosidade da formulação e a capacidade de geração de espuma possuam importância relativa na capacidade de limpeza, estes são parâmetros que definem a escolha do consumidor e, por isto, são essenciais critérios para avaliação desses produtos.

De acordo com o exposto, esta pesquisa visou o desenvolvimento e a avaliação da estabilidade, por

*Autor correspondente:* Daniela D’Almeida Peres - Laboratório de Cosmologia, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 590, Bl. 15, Conjunto das Químicas, Cidade Universitária, 05508-900, São Paulo - SP, Brasil. Telefone: +55 (11) 3091-2358 / +55 (11) 3515-6263, Fax: +55 (11) 3015-4418, E-mail: danielca.peres@usp.br



## Assessment of *in vitro* Sun Protection Factor (SPF) and rheological profile of commercial infant sunscreens

Fernanda Daud Sarruf<sup>1</sup>; Daniela D'Almeida Peres<sup>1\*</sup>; Deborah de Oliveira Nishikawa<sup>1</sup>; Vladi Olga Consiglieri<sup>1</sup>; Telma Mary Kaneko<sup>2</sup>; Maria Valéria Robles Velasco<sup>3</sup>; André Rolim Baby<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil.

### ABSTRACT

This research focused on the measurement of spectral transmittance using an integrating sphere to estimate the Sun Protection Factor (SPF) of commercial sunscreens oriented for child use. Commercially available SPF 30 sunscreens (A, B and C) were selected and assessed by the following methodology: pH measurement; rheological profile analysis; and *in vitro* SPF estimation by spectroscopy. Samples A, B and C exhibited, respectively, pH values of 7.8, 7.4 and 7.0. The rheological profile identified the systems as pseudoplastic non-Newtonian semisolids with hysteresis loops. The t-test ( $p < 0.05$ ) was used to confront the claimed SPF (SPF = 30) with that estimated by spectroscopy. *In vitro* tests are considered of utmost importance in the cosmetic field, since their results may be used to validate submission to subsequent *in vivo* efficacy experiments. According to our results, sunscreens A, B and C generated SPF values without any significant difference from those claimed on the commercial sunscreen labels. The measurement of spectral transmittance with an integrating sphere proved to be a convenient, fast and reproducible method for SPF estimation.

**Keywords:** Sunscreen. *In vitro* SPF. Rheology. Spectral transmittance. Spectroscopy. UV radiation

### INTRODUCTION

The sunlight that reaches the Earth's surface is composed of ultraviolet (200-400 nm), visible (400-800 nm) and infrared (> 800 nm) radiation. The UV radiation is a restricted portions of the electromagnetic spectrum that is traditionally divided into regions labeled UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) and UVA (340-400 nm). The UVA region is also subdivided into UVA1 (340-400 nm) and UVA2 (320-340 nm) (Velasco *et al.*, 2006; DHHS, 2011).

Skin cancer is a significant public health problem and its incidence, morbidity and mortality have increased in recent years. UV radiation is the main etiologic agent in many different types of skin cancer. Even though skin cancer has an excellent prognosis when detected in the early stages, it can and should be prevented with adequate sun protection. The use of sunscreens is thus very important to prevent the growth in the incidence of skin cancer (Kolm *et al.*, 2010; Narayanan *et al.*, 2010).

As well as aiding in the reduction of skin cancer incidence, sunscreens slow the appearance of skin aging signs, as they reduce the amount of UV radiation that reaches the skin. They are mainly employed to prevent the formation of erythema due to sun exposure. In particular, the effects of UVB radiation are cumulative, which suggests a need for sun protection from early childhood (Velasco *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010).

*In vitro* spectrophotometric tests are based on the analysis of the reflection spectrum, collected in a diffuse reflectance spectrophotometer. Sunscreen samples are spread thinly over a suitable surface, avoiding the need to make samples solutions and enabling the evaluation of sunscreens containing physical UV filters (Mansur *et al.*, 1986; Diffey, 1997).

The present research was aimed at determining the *in vitro* sun protection factor (SPF) of commercial sunscreen products for child's use (infants and toddlers), by measuring their spectral transmittance with an integrating sphere technique.

### MATERIAL AND METHODS

Three commercially available SPF 30 sunscreens (A, B and C) for babies and children were selected for the assessment of pH, rheological profile and *in vitro* SPF. The UV filters in each sunscreen are listed in Table 1.

The pH was measured with a Quimis<sup>®</sup> pHmeter. The electrode was introduced into each sample and the reading performed after stabilization.

The rheological profile was assessed with a rheometer (Physica<sup>®</sup> MCR 300 - Anton Paar) operated in cone-plate geometry (cone diameter of 25.0 mm and angle of 1° between cone and plate) (Figueiredo *et al.*, 2008). Samples of approximately 0.5 g were tested at 22.00 ± 0.01 °C and the flow curve recorded at rotational speeds varying from 0.1 to 200.0 s<sup>-1</sup>. The apparent viscosity was determined at maximum shear

Corresponding Author: Daniela D'Almeida Peres - Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cosméticos - Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacéuticas - Universidade de São Paulo - Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 15 - Conjunto das Químicas - Cidade Universitária CEP 05508-900 - São Paulo - SP - Brasil - telefone: +55 (11) 3091-2158 / +55(11)8515-6263 - fax: +55(11)3815-4413 - e-mail: daniela.peres@usp.br

## Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin

### *Estabilidade e eficácia de fotoprotetores contendo filtros inorgânicos e quercetina*

Deborah de Oliveira Nishikawa, Daniela D'Almeida Peres, Camila Areias de Oliveira, Vânia Rodrigues Leite e Silva, Telma Mary Kaneko, Maria Valéria Robles Velasco & André Rolim Baby

School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. São Paulo, SP, Brazil

Email: daniela.peres@usp.br

Fontes de Financiamento: FAPESP e CNPq

#### Abstract

Exposure to the sun can have health benefits, however, excess exposure can cause skin damage, such as skin cancer. Photoprotection can be used as a preventive method against the harmful effects of the ultraviolet (UV) radiation and Brazilian biodiversity is a fertile field for research in this area. Therefore, the aim of this study was the development of sunscreens containing quercetin (bioactive compound) and inorganic filters (titanium dioxide and zinc oxide) with further characterization of the formulae and evaluation of stability. Formulations containing the bioactive compound, isolated or in association with the inorganic filters, presented: pH values biocompatible with the skin; apparent viscosity between 10550 and 23600 cP; sun protection factor (SPF) between 2.1 and 22.5; and broad spectrum protection, with critical wavelengths above 379 nm. It was found that the association of quercetin with inorganic filters was not adequate due to the negative interactions that occurred between the bioactive compound and the metals, which were only identified during the stability study. However, considering the *in vitro* estimated efficacy of the isolated flavonoid, its use can still be explored as an alternative substitute to classic UV filters.

**Keywords:** Photoprotection; Quercetin; Stability; Titanium dioxide, Zinc oxide.

#### Resumo

A exposi o ao sol traz benefícios   saúde, no entanto, o excesso pode ocasionar danos cut ncos dentre os quais se destacam as neoplasias. A fotoprote o   um método para a preven o dos efeitos danosos da radia o ultravioleta (UV) e a biodiversidade Brasileira   campo fértil para pesquisas nesta  rea. Dessa forma, os objetivos deste estudo envolveram o desenvolvimento de formula es fotoprotetoras contendo quercetina (composto bioativo) e filtros solares físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco), com posterior caracteriza o das formula es e avalia o da sua estabilidade. As formula es contendo o composto bioativo, isolado ou em associa o com os filtros físicos, possuiram valores de pH biocompatíveis com a pele, intervalo de viscosidade aparente entre 10550 e 23600 cP; fator de prote o solar (FPS) estimado entre 2.1 e 22.5; e amplo espectro de prote o, com comprimentos de onda crítico acima de 379 nm. Constatou-se que não foi adequado utilizar a quercetina associada aos filtros solares físicos devido às intera es negativas que ocorreram entre o composto e os metais, somente identificadas ao longo do estudo de estabilidade. No entanto, em fun o da eficácia estimada *in vitro* apresentada pelo flavonoide, seu uso ainda pode ser explorado como substituto alternativo aos filtros solares clássicos.

**Palavras-chave:** Dióxido de titânio; Estabilidade; Fotoprote o;  xido de zinco, Quercetina.

Received / Recebido : 30/04/2013

Accepted / Aceite: 03/06/2013

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>

## Impact of stirring speed, glycerin and sodium chloride concentrations on photoprotective nanoemulsions

*Impacto da velocidade de agitação, contração de glicerina e de cloreto de sódio em nanoemulsões fotoprotetoras*

Débora Granemann e Silva<sup>1</sup>, Camila Areias de Oliveira<sup>1</sup>, Daniela D'Almeida Peres<sup>1</sup>, Margarida Pereira<sup>2</sup>, Nicole Pereira<sup>2</sup>, Tânia Santos Almeida<sup>2,3</sup>, Joana Portugal Mota<sup>2</sup>, Catarina Rosado<sup>2</sup>, Vânia Rodrigues Leite-Silva<sup>4</sup>, Maria Valéria Robles Velasco<sup>4</sup>, André Rolim Baby<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>CBios - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Química e Bioquímica / Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacéuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema SP, Brasil.

Diadema, SP, Brasil  
Email: andrerb@usp.br

Fontes de Financiamento: FAPESP e CNPq

### Abstract

New technologies that improve the physical as the sensory properties of sunscreens can help to increase its continued use and impact on health. The use of nanoemulsions in the development of photoprotective vehicles is an advantage, since nanostructured components may have superior properties regarding their performance when compared to conventional products. The advantages of using nanobiotechnology in manufacture of cosmetic and dermatological formulations arise from the protection of compounds from chemical or enzymatic degradation, from the control of their release, and also to the prolonged retention time of cosmetic ingredients in the stratum corneum. Thus, this study aimed to evaluate the impact of stirring speed and of glycerin and sodium chloride concentrations in the development and effectiveness of a nanoemulsion containing ethylhexyl methoxycinnamate and benzophenone-3. The results of statistical analyses regarding the impact of the variables in the process of nanoemulsion development showed that these parameters affect the phase inversion temperature (PIT). However, this did not affect the particle size and the photoprotective efficacy *in vitro*.

**Key-words:** Nanoemulsion; Photoprotection; Ethylhexyl methoxycinnamate; Benzophenone-3

### Resumo

Novas tecnologias que melhorem a aparência física e o sensorial de fotoprotetores podem ajudar a aumentar a continuidade do uso e o seu impacto em saúde. A utilização de nanoemulsões como veículos cosméticos para o desenvolvimento de fotoprotetores, torna-se uma vantagem, pois componentes nanoestruturados podem apresentar propriedades superiores quanto a sua performance em comparação a produtos convencionais. Do ponto de vista científico, as vantagens do uso da nanobiotecnologia na produção de nanocosméticos e formulações dermatológicas são concernentes à proteção de compostos quanto à degradação química ou enzimática, ao controle de sua liberação e ao prolongamento do tempo de retenção dos ativos cosméticos no estrato córneo. Este estudo pretende avaliar a influência de diversas variáveis no processo de desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* de uma nanoemulsão contendo p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3, obtida empregando o método da temperatura de inversão de fases (PIT). Os resultados demonstram que a velocidade de agitação, a concentração de glicerina e a do cloreto de sódio influenciam a temperatura em que a emulsão inverte de A/O para O/A (PIT) das formulações compostas de p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3, entretanto, não influenciam o tamanho de partícula nem a eficácia fotoprotetora *in vitro*.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão; Fotoproteção; p-metoxicinamato de octila; Benzofenona-3.

Received / Recebido: 30/04/2014

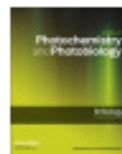
Accepted / Aceite: 30/09/14

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)

## Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products



Camila Areias de Oliveira<sup>a,\*</sup>, Daniela D'Almeida Peres<sup>a</sup>, Caynan Mendes Rugno<sup>a</sup>, Mayara Kojima<sup>a</sup>, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto<sup>a</sup>, Vladi Olga Consiglieri<sup>a</sup>, Telma Mary Kaneko<sup>a</sup>, Catarina Rosado<sup>b</sup>, Joana Mota<sup>b</sup>, Maria Valéria Robles Velasco<sup>a</sup>, André Rolim Baby<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy, University of São Paulo, 580 Prof. Líbero Pinheiro Av., Il. 15, Conjunto das Quilôcas, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil  
<sup>b</sup>CIBIOS-Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 September 2014  
 Received in revised form 8 April 2015  
 Accepted 13 April 2015  
 Available online 20 April 2015

### ABSTRACT

Sunscreens are the most-established approach for photoprotection. The strategy of providing antioxidant properties to sun care products by addition of natural and potent anti-free radical compounds has led to the development of bioactive sunscreens, able to neutralize the harmful effects of ultraviolet (UV) radiation. UVA filters, such as benzophenone-3 (BP) and butyl methoxydibenzoylmethane (BMDMB), can exhibit photodegradation which limits the development of broad spectrum sunscreens. Previous research verified that rutin interacts with filters incorporated in sunscreens. In this work, we focused on the development and evaluation of the efficacy of the sunscreens containing either BP or BMDMB with and without rutin. The addition of rutin to the UVA filters afforded antioxidant properties to the formulations and they were considered safe for human use. Additionally, rutin in combination with either BP or BMDMB increased the antioxidant activity about 40 times when compared with the UVA filters alone. Remarkably, the addition of rutin 0.1% (w/w) to BP 6.0% (w/w) raised the SPF from  $24.3 \pm 1.53$  to  $33.3 \pm 2.89$ . In conclusion, these findings demonstrated that the addition of rutin into sunscreens can markedly improve the antioxidant properties of the formulation as well as photostabilize some of the UVA filters.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The harmful effects of UV exposure have been widely described in the scientific literature. The solar radiation spectrum may be subdivided into UVC (100–280 nm); UVB (280–315 nm) and UVA (315–400 nm). The UVC-light is filtered by the atmosphere and does not reach the surface, whereas UVB-light penetrates the upper layers of the skin, producing DNA-damage and sunburn. The UVA radiation reaches deeper skin layers, causing photocarcinogenesis and photoaging. Protection against UVA and UVB radiation is essential, since both are involved in skin cancer [1–5].

The last decade registered a higher incidence of skin cancer, representing a public health problem. In response to this issue, international health authorities recommend protection against the harmful effects of UV radiation. Current photoprotection methods include avoiding sun exposure during the highest incidence of radiation, use of appropriate clothing and sunscreen application.

Nowadays, sunscreens are the most established strategy and are commonly used by the majority of the population [4–6].

Organic and inorganic UV filters are currently used for this purpose, acting by different mechanisms when applied on the skin. Inorganic filters reflect the incident radiation and absorb part of the radiation that reaches the skin, while organic filters absorb UV radiation. This mechanism makes organic filters susceptible to photodegradation and able to generate free radicals [4–6].

Benzophenone-3 (BP) and butyl methoxydibenzoylmethane (BMDMB) are frequently used as UVA organic filters in sun care products. However, these chemical compounds are generally described as photounstable, limiting the development of broad spectrum sunscreens. A strategy to overcome this problem is the combination of organic filters with bioactive ingredients possessing photoprotective and antioxidant properties, thereby complementing UV filter photoprotection and preventing or reducing the damage from free radicals [4–9].

Rutin (quercetin-3-O-rutinoside) is a flavonoid with a remarkable antioxidant activity. Recent findings indicated that rutin, when incorporated in oil-in-water emulsions, at a concentration of 10% (w/w), reached sun protection factor (SPF) values similar

\* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 2358; fax: +55 11 3815 4418.  
 E-mail address: [caareias@usp.br](mailto:caareias@usp.br) (C.A. de Oliveira).

## CAPÍTULO 11

# Desodorantes e Antiperspirantes

*Maria Valéria Robles Velasco*

*Fernanda Daud Sarruf*

*Daniela D'Almeida Peres*

*André Rolim Baby*

### 11.1 Introdução

O alvo principal da ação das preparações desodorantes e antiperspirantes são as axilas, embora, na primeira categoria, é permitido considerar a ação corporal. Tais produtos agem, principalmente, sobre a microflora, as glândulas sudoríparas e suas secreções.

Os antiperspirantes agem na inibição do fluxo da perspiração/transpiração. Seu foco envolve a redução do suor liberado, alterando o ambiente de crescimento dos micro-organismos. Os desodorantes reduzem ou modificam os odores originados pela perspiração originariamente inodora que, pela ação bacteriana na superfície da pele, por exemplo, adquire o odor considerado desagradável.

Este capítulo aborda aspectos fisiológicos da perspiração, enfatizando os mecanismos de ação das preparações desodorantes e antiperspirantes, seus compostos ativos e formas cosméticas de apresentação.

### 11.2 Fisiologia da Perspiração

As glândulas sudoríparas são apêndices ou anexos cutâneos e classificadas em três variedades: glândulas sudoríparas écrinas, apócrinas e apoécricas.

As glândulas sudoríparas écrinas existem desde o nascimento do indivíduo e estão presentes em, praticamente, toda a superfície do corpo, com exceção dos lábios, base das unhas e determinadas regiões das genitálias. Sua densidade média é de 100 a 200 glândulas/cm<sup>2</sup>, variável entre os indivíduos e em cada sítio anatômico. Estão presentes em maior quantidade nas axilas, (cada uma contendo cerca de 25000 glândulas/cm<sup>2</sup>), na palma das mãos e plantas dos pés (aproximadamente 600-700 glândulas/cm<sup>2</sup>). Por outro lado, estão presentes em menor densidade no dorso, com aproximadamente 64 glândulas/cm<sup>2</sup>. Elas são responsáveis

**Anexo J: Artigos científicos submetidos para publicação, em avaliação****BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICALSCIENCES****RECIBO****Nº de Registro: 025/15**

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

**Autoria:** Paula Souza Prestes, Daniela D'Almeida Peres, Anderson Zanardi de Freitas, Vladi Olga Consiglieri, Telma Mary Kaneko, Maria Valéria Robles Velasco, André Rolim Baby

**Título:** Particle size and morphological characterization of cosmetic emulsified systems by Optical Coherence Tomography (OCT)

São Paulo, 28 de Janeiro de 2015.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira  
Editoria Científica

---

De: **joergen.vedelskov.serup@regionh.dk**  
Enviada: segunda-feira, 18 de maio de 2015 18:25:46  
Para: **milaareias@hotmail.com**  
Cc: **dani\_aperes@hotmail.com; milaareias@hotmail.com; andrerbaby@icloud.com; viviane.kaori@gmail.com; joana.mota@ulusofona.pt; p1657@ulusofona.pt; siglieri@usp.br; tsakuda@usp.br; mvrobles@usp.br; andrerb@usp.br**

18-May-2015

Dear Ms Oliveira:

Your manuscript entitled "Rutin increases critical wavelength of systems containing a single UV filter and with good skin compatibility" by Peres, Daniela; Oliveira, Camila; Costa, Mariana; Tokunaga, Viviane; Mota, Joana; Rosado, Catarina; Consiglieri, Vladi; Kaneko, Telma; Velasco, Maria Valéria; Baby, André, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Skin Research and Technology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is SRT-0089-15.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/srandt> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/srandt>.

Thank you for submitting your manuscript to the Skin Research and Technology.

Sincerely,  
Skin Research and Technology Editorial Office