

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

**Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona
(filtro UVA) e do ρ -metoxicinamato de octila (filtro UVB)**

Claudinéia Aparecida Sales De Oliveira Pinto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Prof^a. Assoc.^a Maria Valéria
Robles Velasco

São Paulo
2014

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

**Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona
(filtro UVA) e do ρ -metoxicinamato de octila (filtro UVB)**

Claudinéia Aparecida Sales De Oliveira Pinto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles
Velasco

São Paulo
2014

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

Pinto, Claudineia Aparecida Sales de Oliveira
P659i Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzone (filtro
UVA) e do β -metoxicinamato de octila (filtro UVB) / Claudineia
Aparecida Sales de Oliveira Pinto. -- São Paulo, 2014.
212p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Velasco, Maria Valéria Robles

1. Proteção solar : Cosméticos 2. Estabilidade 3. Flavonoides
4. Ressonância magnética I. T. II. Velasco, Maria Valéria Robles,
orientador.

668.55 CDD

Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto

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

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

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

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, _____ de 2014.

*Ao meu marido,
Cléber*

*Aos meus filhos,
Arthur e Heitor,*

*À minha mãe,
Maria das Graças,*

*À minha irmã,
Uilma,*

*Aos meus sobrinhos,
Victor, Gabriela e Lennon*

*Aos meus sogros,
Osseon e Isabel (in memoriam),*

*Aos meus amigos,
Nilcéia, Tarcisio e Isabella*

À minha orientadora,

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco

Agradecimentos

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

Ao Prof. Dr. André Rolim Baby.

Às professoras Dr.^a Cristina Helena dos Reis Serra , Dr.^a Eliane Ribeiro, Dr.^a Eunice Kazue Kano, Dr.^a Silvia Storpirtis, Dr.^a Valentina Porta e Dr.^a Vladi Olga Consiglieri.

À Prof.^a Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Prof.^a Titular Elfriede Marianne Bacchi e Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko.

Ao Prof. Assoc. Dr. Humberto Gomes Ferraz.

À Prof.^a Dr.^a Dominique Corinne Hermine Fischer.

Aos professores, Dr. Paulo Roberto H. Moreno e Dr.^a Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

À Dr.^a. Maria Inês de Almeida Gonçalves, Edgar Muniz Machado Junior e Dr. Jose de Sousa Sobrinho.

À Gabriela Maria D'Angelo. Costa.

Ao Tércio Elyan Martins, Michele Georges Issa, Eremita Souza Santos e Marcelo Dutra Duque.

Ao Fernando Soares de Lima e Karina Uru Oshio.

À Camila Areias de Oliveira, Daniela D'Almeida Peres e Michelle Ferrera Dario.

Ao Marcelo Guimarães, Guilherme Diniz Tavares, Juliana Pereira Maura Rossato, Mônica Maria Coquemala da Silva, André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Michelle Maria Gonçalves Barão de Aguiar, Marina de Freiras Silva e José Eduardo Gonçalves.

Ao Alceu Totti e Roberto de Jesus Honório.

À Samira Inoue e Daniela Akutagawa.

À Elisabete Claro de Souza Paiva, David Olimpio de Lima Filho, Alexandre Spitalare, Kelma Lydis Oliveira Alves Guitman e Luiz Carlos Caous.

À Doralide Rita de Jesus Santos.

A Elaine Midori Ychico, Jorge Alves de Lima e Miriam Alves Wrigg.

À todos que colaboraram para realização deste trabalho.

“Só sabemos da ignorância até as fronteiras, as bordas, de nossa ignorância. Quanto mais sabemos, mais nos damos conta do que não sabemos. A parte mais importante do conhecimento é a ignorância, porque ela permite nos darmos conta de que há outras perguntas que podemos formular.”

David Jonathan Gross

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE EQUAÇÕES	xx
LISTA DE FIGURAS	xxii
CAPÍTULO 1. Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i>-metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol).....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 FILTROS SOLARES	7
2.1.1 BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM)	12
2.1.2 ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (ehmc)	14
2.1.3 BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE(BEMT)	15
2.2 ESPECTROSCOPIA DE RMN QUANTITATIVA (qRMN).....	16
2.2.1 MÉTODO RELATIVO.....	17
2.2.2 MÉTODO ABSOLUTO	19
2.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO	23
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAL.....	33
4.1.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	33
4.1.2 SOLVENTE.....	32
4.1.3 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	33
4.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS.....	33
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	35
4.2.2 CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	35
4.2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS POR qRMN	35
4.2.4 SELETIVIDADE	36
4.2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	37
4.2.5 LINEARIDADE.....	37
4.2.6 PRECISÃO E EXATIDÃO	38
4.2.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	38
4.2.8 LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	39
4.2.9 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO BMBM, EHMC e BEMT EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 SELETIVIDADE	41
5.2 LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO, PRECISÃO E EXATIDÃO	47
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

CAPÍTULO 2.	Avaliação da influência da adição da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (ρ -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona).....	64
1. INTRODUÇÃO.....		65
2. REVISÃO DA LITERATURA.....		70
2.1	FOTOPROTEÇÃO.....	71
2.2	DESENVOLVIMENTO DE FOTOPROTETOR.....	75
2.2.1	VEÍCULOS COSMÉTICOS/FARMACÊUTICOS	77
2.3	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA	80
2.4	FOTOESTABILIDADE DE FILTROS SOLARES.....	88
2.5	RUTINA.....	91
3. OBJETIVOS.....		94
3.1	OBJETIVO GERAL.....	95
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95
4. MATERIAL E MÉTODOS.....		96
4.1	MATERIAL.....	97
4.1.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	97
4.1.2	SOLVENTES	98
4.1.3	SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA	98
4.1.4	MATÉRIAS-PRIMAS.....	98
4.1.5	OUTROS MATERIAIS.....	99
4.2	MÉTODOS	100
4.2.1	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	100
4.2.2	TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR	102
4.2.2.1	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	103
4.2.2.2	CONDIÇÕES	104
a)	CENTRIFUGAÇÃO	104
b)	ESTRESSE TÉRMICO.....	104
c)	EFICÁCIA FOTOPROTETORA <i>IN VITRO</i>	104
4.2.3	AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DAS EMULSÕES.....	105
4.2.4	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DA RUTINA NA FOTOESTABILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA CONTENDO BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE E ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE.....	105
4.2.4.1	AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE – RADIAÇÃO SOLAR NATURAL.....	108
4.2.5	TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	111
4.2.5.1	PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA.....	113
4.2.5.1.1	PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICO – pH	113
4.2.5.1.2	AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE	113
a)	ATIVIDADE ANTIRRADICALAR.....	113
b)	FOTOESTABILIDADE DAS EMULSÕES.....	114
4.2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS REALIZADOS	114
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		115
5.1	TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	116
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DA RUTINA NA FOTOESTABILIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA CONTENDO BUTYL METOXYDIBENZOYLMETHANE E ETHYLHEXYL ETOXICINNAMATE..	120
5.2.1	AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE – RADIAÇÃO SOLAR NATURAL ..	131
5.3	TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA	135
6. CONCLUSÕES.....		148
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		151

CAPÍTULO 3.	Avaliação da interação da rutina com os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona).....	164
1. INTRODUÇÃO		165
2. REVISÃO DA LITERATURA		168
2.1	MECANISMOS DE FOTOESTABILIZAÇÃO DE FILTROS SOLARES.....	169
3. OBJETIVOS		172
4. MATERIAL E MÉTODOS		174
4.1	MATERIAL.....	175
4.1.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	175
4.1.2	SOLVENTES.....	175
4.1.4	MATERIAS-PRIMAS – GRAU FARMACÊUTICO.....	175
4.1.5	OUTROS MATERIAIS.....	176
4.2	MÉTODOS.....	176
4.2.1	ANÁLISE TÉRMICA.....	176
a)	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIO DIFERENCIAL – DSC.....	176
b)	TERMOGRAVIMETRIA – TG.....	176
4.2.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES MOLECURAES CAUSADAS PELA RADIAÇÃO UV UTILIZANDO ¹ HRMN.....	177
4.2.2.1	CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	178
4.2.3	ANÁLISE QUALITATIVA DA SUPRESSÃO DO ESTADO ENERGÉTICO SINGLETO.....	180
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO		183
5.1	ANÁLISE TÉRMICA – DSC e TG.....	184
5.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES CAUSADAS PELA RADIAÇÃO UVUTILIZANDO ¹ HRMN.....	193
5.3	ANÁLISE QUALITATIVA DA SUPRESSÃO DO ESTADO DE ENERGIA SINGLETO.....	202
6. CONCLUSÕES		206
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		209

Resumo

PINTO, C.A.S.O. **Influência da rutina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do ρ -metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. 2014. 212f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Com o intuito de promover proteção de amplo espectro, na maioria dos protetores solares estão associados pelo menos dois filtros orgânicos (UVA e UVB). A combinação da avobenzona (BMBM), filtro UVA, e do ρ -metoxicinamato de octila (EHMC), filtro UVB, é conhecida e muito utilizada em formulações manipuladas e industrializadas, porém apresenta alteração na absorção espectral após exposição à radiação UV. A estratégia empregada com maior frequência para reduzir a instabilidade da combinação é baseada na adição de agentes fotoestabilizadores. A adição de substâncias naturais em formulações fotoprotetoras vem sendo explorada, especialmente o grupo dos flavonoides, como a rutina, que apresenta resultados positivos em relação à eficácia fotoprotetora. O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar o potencial da rutina como substância fotoestabilizadora dos filtros EHMC e BMBM. Foram desenvolvidas formulações contendo os dois filtros associados ou não com rutina de acordo com planejamento fatorial em três níveis. As formulações foram avaliadas quanto a eficácia fotoprotetora *in vitro* aplicadas em placas de PMMA e analisadas por espectrofotometria de refletância com esfera de integração antes e após a exposição à radiação UV. As interações moleculares dos filtros com a rutina foram avaliadas por ^1H RMN, DSC, TG e análise qualitativa da supressão do estado energético singleto. A adição de rutina nas formulações contendo 5,0% (p/p) de BMBM e 10,0% (p/p) de EHMC promoveu elevação na conservação do FPS *in vitro* de 53,9% para 65,8 (0,1% de rutina) e 70,8% (1,0% de rutina). As curvas DSC e TG da rutina apresentaram alterações promovidas pela presença dos filtros BMBM e EHMC, indicando interação entre o flavonoide e os filtros. Após dose de 5760 J cm^{-2} de radiação UV o valor da razão *trans/cis* para o filtro EHMC em solução adicionado do filtro BMBM foi elevado de $5,5 \pm 0,1$, sem adição de rutina, para $12,6 \pm 0,4$, com adição da rutina. A análise qualitativa da supressão do estado singleto indicou que um dos mecanismos envolvidos na fotoestabilização dos filtros BMBM e EHMC é a supressão do estado energético singleto. Os resultados reportados neste estudo indicaram que a adição da rutina em formulações fotoprotetoras representa um caminho simples e efetivo para elevar a fotoestabilidade da combinação dos filtros BMBM e EHMC. A adição da rutina em formulações fotoprotetoras representa uma estratégia promissora, pois aliada a ação fotoestabilizadora, verificada nesse estudo, esse flavonoide possui propriedades antioxidante e quelante de metais que podem colaborar para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras de amplo espectro com aumento da segurança e eficácia.

Palavras-chave: rutina, fotoestabilidade, avobenzona, ρ -metoxicinamato de octila, ^1H RMN quantitativo.

Abstract

PINTO, C.A.S.O. **Influence of rutin in photostabilization of avobenzone (UVA filter) and octyl methoxycinnamate (UVB filter)**. 2014. 212p. Thesis (Doctoral Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2014.

In order to promote broad-spectrum protection, most sunscreens are associated with at least two organic filters (UVA and UVB). The combination of avobenzone (BMBM), UVA filter, and octyl methoxycinnamate (EHMC), UVB filter, is well known and widely used in industrial formulations and pharmaceutical compounding, but shows alteration in spectral absorption after UV radiation exposure. The most commonly used strategy to reduce the instability of the combination is based on the addition of photostabilizer agents. The addition of natural substances in sunscreen formulations has been explored, especially the group of flavonoids such as rutin, which shows positive results regarding photoprotective efficacy. The main objective of this research was to evaluate the potential of rutin as a photostabilizer substance of EHMC and BMBM. Formulations were developed containing the two filters associated or not with rutin, according to factorial design at three levels. The formulations were evaluated for *in vitro* photoprotective efficacy applied on PMMA plates and analyzed by spectrophotometer with integrating sphere reflectance before and after exposure to UV radiation. Molecular interactions of filters with rutin were evaluated by ^1H NMR, DSC, TG and qualitative analysis of the suppression of singlet energy state. The addition of rutin in the formulations containing 5.0 % (w/w) BMBM and 10.0 % (w/w) EHMC promoted an increase in the preservation of *in vitro* SPF of 53.9% to 65.8 (0.1 % rutin) and 70.8 % (1.0% rutin). The DSC and TG curves of rutin showed changes promoted by the presence of BMBM and EHMC filters, indicating interaction between the flavonoid and filters. After 5760 J cm^{-2} of UV radiation the value of the *trans/cis* ratio for the EHMC filter added from the BMBM filter was increased from 5.5 ± 0.1 without addition of rutin, to 12.6 ± 0.4 , with the addition of rutin. Qualitative analysis of the suppression of the singlet state indicated that one of the mechanisms involved in the photostabilization BMBM and EHMC filters is suppression of singlet excited state. The results reported in this study indicate that the addition of rutin in sunscreen formulations is a simple and effective way to increase the photostability of the combination of BMBM and EHMC. The addition of rutin in sunscreen formulations represents a promising strategy, for allied with the photostabilization action, observed in this study, this flavonoid has antioxidant and chelating properties of metals that can contribute to the development of broad-spectrum sunscreens formulations with increased safety and efficacy.

Keywords: rutin, photostability, avobenzone, octyl methoxycinnamate, quantitative ^1H NMR.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

^1H	deutério
3D	três dimensões
Amp	ampicilina
ANOVA	<i>Analyses of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association Of Analytical Communities</i>
AUS	Austrália
BEMT	BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE
BMBM	BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE
BRA	Brasil
CDCl_3	clorofórmio deuterado
CE	Comunidade Européia
CFR	<i>Code of Federal Regulation (FDA)</i>
CG	Cromatografia a Gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração Média Determinada
CME	Concentração Média Experimental
CMF	<i>Cloud Modification Factor</i>
COLIPA	European Cosmetic, Toiletry and Perfumary Association
CPTEC	Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos
CT	Concentração Teórica
D_2O	óxido de deutério
DAS	Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais
DME	Dose Mínima para produzir Eritema
DMSO	dimetil sulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	dimetil sulfóxido deuterado

DNA	Ácidos Desóxi-ribonucleicos
DOE	<i>Design of Experiments</i>
DP	Desvio Padrão
DPPH*	2,2-difenil-1-picriidrazila
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
E	Exatidão
EHMC	ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de Proteção Solar
IC	Inclinação da Curva de calibração
h	constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
INN	<i>International Non-proprietary Name</i>
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IPD	<i>Immediate Pigment Darkening</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MED	<i>Minimal Erythema Dose</i>
MHZ	Mega Hertz
N ₂	nitrogênio
p/p	peso/peso
PMMA	polimetilmetacrilato
PPD	<i>Persistent Pigment Darkening</i>
ppm	parte por milhão
Pt	platina

qRMN	Ressonância Magnética quantitativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SED	<i>Standard Erythema Dose</i>
$T_{\text{fusão}}$	Temperatura de fusão
TGA/DTA	Termogravimetria/Análise Térmica Diferencial
TGA	<i>Therapeutic Goods Administration</i>
TMS	tetrametilsilano
UTC	<i>Universal Time Coordinated</i>
UV	Ultra Violeta
UVAPF	Fator de Proteção Ultra Violeta A
UVB	Ultra Violeta B
v/v	volume/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\Delta H_{\text{fusão}}$	entalpia de fusão
δ	deslocamento químico
λ_c	comprimento de onda crítico
ν	frequência de radiação absorvida

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1. Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol)	
Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Comunidade Européia e Austrália (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).	8
Quadro 2. Materiais de referência de qRMN, registrados como padrão interno para hidrogênio, flúor e fósforo (GADAPE & PARIKH, 2011; MALZ, 2008, WELLS <i>et al.</i> , 2002).....	19
CAPÍTULO 2. Avaliação da influência da adição da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)	
Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Ponderação $E(\lambda) \times I(\lambda)$ empregada no calculo do fator de proteção solar por espectrofotometria com fator de correção igual a 10,0 (VELASCO <i>et al.</i> , 2011, SAYRE <i>et al.</i> , 1979).....	82
Quadro 2. Características básicas de procedimentos dos métodos EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION e UNITED STATES para a determinação da eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> (UNITED STATES, 2011; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011).	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol)

- Tabela 1.** Dados experimentais da análise ^1H RMN da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM), solubilizada em CDCl_3 , e da literatura solubilizada em C_6D_6 (Mturi & Martincigh, 2008). Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação deste filtro..... 43
- Tabela 2.** Dados experimentais da análise de ^1H RMN do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) e dados da literatura (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001), ambos solubilizados em CDCl_3 . Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação deste filtro. 44
- Tabela 3.** Dados experimentais da análise de ^1H RMN do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT) solubilizado em CDCl_3 . Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação deste filtro 45
- Tabela 4.** Resultados obtidos por meio da análise da regressão linear e determinação quantitativa pelo método ^1H qRMN e LQ e LD para os filtros BMBM, BEMT e EHMC, simultaneamente 49
- Tabela 5.** Resultados da precisão e exatidão, avaliadas pela repetibilidade intra-dia e inter-dias, sendo a precisão expressa como desvio padrão relativo (DPR), e a exatidão pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente, dos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** em solução..... 51
- Tabela 6.** Resultados da precisão e exatidão calculados para a quantificação simultânea dos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** na formulação fotoprotetora e avaliados pela repetibilidade intra-dia e inter-dias, sendo a precisão expressa como desvio padrão relativo (DPR), e a exatidão pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente.. 52

CAPÍTULO 2. Avaliação da influência da adição da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)

- Tabela 1.** Composição quali e quantitativa (%p/p) das emulsões avaliadas no *Teste de Estabilidade Preliminar (1 a 7)*..... 102

Tabela 2.	Codificação utilizada para o planejamento fatorial das formulações fotoprotetoras em três níveis de concentração (proporção % p/p) dos componentes ativos.....	107
Tabela 3.	Planejamento fatorial <i>DOE 3^k</i> , para a avaliação da influência da rutina na fotoestabilização da mistura dos filtros UV BMBM e EHMC veiculados em emulsão O/A (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).....	107
Tabela 4.	Avaliação do aspecto e cor das formulações contendo BMBM 5% (p/p) e EHMC 10%(p/p) durante o <i>Teste de Estabilidade Preliminar</i> e avaliação da eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> das formulações aprovadas. Variações das combinações e concentrações do co-polímero pré-neutralizado e da base autoemulsificante de ésteres fosfatados (e) alcoóis graxos.	117
Tabela 5.	Avaliação da influência da rutina no FPS <i>in vitro</i> de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.....	121
Tabela 6.	Avaliação da influência da rutina no λ_c de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.....	122
Tabela 7.	Avaliação da influência da rutina no razão UVA/UVB de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.....	122
Tabela 8.	Avaliação eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> de emulsões antes e após a irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM na concentração intermediária e máxima e rutina nos 3 níveis de concentração propostos.....	130
Tabela 9.	Manutenção do FPS <i>in vitro</i> após exposição à radiação natural das formulações BMBM+R-; BMBM+R0; BMBM+R+ e BEMT5	132
Tabela 10.	Resultados da manutenção do FPS <i>in vitro</i> para as formulações BMBM+R-; BMBM+R0; BMBM+R+ e BEMT5	133
Tabela 11.	Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção <i>in vitro</i>) e quantificação dos filtros BMBM e EHMC no início e ao final da <i>Teste de Estabilidade Acelerada</i> – formulação BMBM+ R-	137
Tabela 12.	Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção <i>in vitro</i>) e quantificação dos filtros BMBM e EHMC no início e ao final da <i>Teste de Estabilidade Acelerada</i> – formulação BMBM+R0	138
Tabela 13.	Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção <i>in vitro</i>) e quantificação dos filtros BMBM e EHMC no início e ao final da <i>Teste de Estabilidade Acelerada</i> – formulação BMBM+R+	139

Tabela 14. Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção <i>in vitro</i>) e quantificação dos filtros BMBM , EHMC e BEMT no início e ao final do <i>Teste de Estabilidade Acelerada</i> – formulação BEMT5	140
---	-----

CAPÍTULO 3. Avaliação da interação da rutina com os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)

Tabela 1. Soluções avaliadas quanto a alterações moleculares frente à radiação UV.....	177
---	-----

Tabela 2. Soluções dos filtros BMBM e EHMC adicionados ou não de rutina.	181
---	-----

Tabela 3. Quantificação das alterações moleculares apresentadas pelos filtros BMBM e EHMC combinados ou separados, com ou sem a adição de rutina, em solução de DMSO, após exposição à radiação UV.....	194
--	-----

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 1. Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol)	
Equação 1. Cálculo da área do sinal integrado em qRMN	17
Equação 2. Relação da intensidade do espectro e número de núcleos locais.....	17
Equação 3. Razão molar pelo método relativo em qRMN.....	18
Equação 4. Cálculo da fração de um componente em uma mistura, por qRMN	18
Equação 5: Cálculo para obtenção da concentração da substância pelo método absoluto qRMN	20
Equação 6: Cálculo para obtenção da concentração da substância pelo método absoluto qRMN	36
Equação 7: Cálculo do Desvio Padrão Relativo do método analítico	38
Equação 8: Cálculo da Exatidão do método analítico	38
Equação 9: Cálculo do Limite de Detecção do método analítico	39
CAPÍTULO 2. Avaliação da influência da adição da rotina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)	
Equação 1: Fator de Proteção Solar.....	81
Equação 2: Cálculo do FPS preconizado por MANSUR <i>et al.</i> , 1986.....	83
Equação 3: Determinação do FPS <i>in vitro</i> por meio da transmitância difusa (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO <i>et al.</i> , 2011).	84
Equação 4: Avaliação do Fator de Proteção UVA <i>in vitro</i> , medido antes da exposição UVA, UVAPF ₀ <i>in vitro</i> (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO <i>et al.</i> , 2011).	84
Equação 5: Avaliação do Fator de Proteção UVA <i>in vitro</i> , medido após exposição UVA, UVAPF <i>in vitro</i> (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO <i>et al.</i> , 2011).	84
Equação 6. Razão UVA/UVB, calculada por meio da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB (VELASCO <i>et al.</i> , 2011; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN <i>et al.</i> , 1999).	85

Equação 7.	Razão UVA/UVB, calculada por meio da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB (VELASCO et al., 2011; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN et al., 1999).	85
Equação 8.	Cálculo da razão FPS, determinado <i>in vivo</i> , e fator de proteção UVA <i>in vitro</i> UVAPF.	85
Equação 9.	Cálculo da porcentagem de Retenção da Resistência à água (RRA)	86
Equação 10.	Cálculo do Índice UV	109
Equação 11.	Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH* (BRAND-WILLIAMS et al., 1997).	114
CAPÍTULO 3.	Avaliação da interação da rutina com os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)	
Equação 1.	Cálculo da razão EHMC <i>trans/cis</i> e BMBM enol/ceto, K=constante de equilíbrio	178

LISTA DE FIGURAS

- CAPÍTULO 1.** Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol)
- Figura 1.** Estrutura química da molécula da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM) na forma cetônica e enólica, adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008 13
- Figura 2.** Fórmula estrutural do *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE* (EHMC) adaptado de PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001..... 14
- Figura 3.** Fórmula estrutural do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT), adaptado de DENCAUSSE, *et al.*, 2008. 15
- Figura 4.** Espectros de ¹H RMN dos filtros analisadas individualmente, BMBM (a) = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, EHMC (b) = *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE* e BEMT (c) = BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE e na mistura dos três, com destaque para os sinais dos núcleos de H selecionados para cada filtro. 42
- Figura 5.** Forma estrutural da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM), em destaque (na cor vermelha) estão as posições dos hidrogênios selecionados para quantificação por meio da qRMN. 43
- Figura 6.** Forma estrutural do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC), em destaque (na cor verde) está marcada a posição do hidrogênio selecionado para quantificação por meio da qRMN..... 44
- Figura 7.** Forma estrutural do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT), em destaque (na cor roxa) está marcada a posição do hidrogênio selecionado para quantificação por meio da qRMN 45
- Figura 8.** Forma estrutural da molécula de dimetilsulfona, utilizada como padrão interno para a quantificação dos filtros UV. 46
- Figura 9.** Espectro de ¹H RMN da formulação com os filtros químicos BMBM, BEMT e EHMC (a) e da formulação isenta dos filtros químicos (b), com destaque para os sinais dos núcleos de H selecionados para cada filtro. 47

Figura 10. Linearidade do método de quantificação simultânea ¹ H RMN para os filtros BMBM (BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE) (a) , BEMT (BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE) (b) e EHMC (ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE) (c) e avaliada pela relação entre a massa real e a massa obtida em mg	48
---	----

CAPÍTULO 2. Avaliação da influência da adição da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)

Figura 1. Akhenaton: Akhenaton, Nefertiti e três filhos de seus filhos sob os raios do deus sol Aton (Fonte: ENCICLOPEDIA BRITANICA, GALLERIES, 2013).....	71
Figura 2. Forma de atuação dos filtros UV orgânicos e inorgânicos (adaptado de MANAIA <i>et al.</i> 2013).....	74
Figura 3. Deslocamento eletrônico de uma molécula absorvedora de radiação UV (adaptado de HENRIQUES, 2008; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO, 2004; WOLF <i>et al.</i> , 2001).	75
Figura 4. Representação de uma formulação fotoprotetora aplicada sobre a pele. (a) formulação que não promoveu a formação de um filme uniforme sobre a pele. (b) formulação que promoveu a formação de filme uniforme (adaptado de TANNER, 2006).....	78
Figura 5. Representação esquemática da fórmula estrutural da rutina (BABY, 2007; BARRETO, 2005).	92
Figura 6. Frutos verdes da Fava D'Anta no ponto ideal de coleta (FILIZOLA, 2013.....	93
Figura 7. Irradiância média no Brasil em 20 de agosto de 2013. Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, 2013.	110
Figura 8. Índice Ultra Violeta, na cidade de São Paulo, em 20 de agosto de 2013, horário GMT. Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, 2013.....	111
Figura 9. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial <i>DOE 3²</i> no FPS <i>in vitro</i> (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC... ..	123

Figura 10. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial <i>DOE</i> 3 ³ no λ_c <i>in vitro</i> (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC.....	123
Figura 11. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial <i>DOE</i> 3 ³ na razão UVA/UVB (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC.....	124
Figura 12. Avaliação da manutenção do FPS <i>in vitro</i> para as formulações BMBM+R-; BMBM+R0; BMBM+R+ e BEMT5 expostas a radiação solar natural.....	132
CAPÍTULO 3. Avaliação da interação da rutina com os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (<i>p</i> -metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)	
Figura 1. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singleto e tripleto (adaptado BONDA, 2009).....	169
Figura 2. Representação gráfica das vias de desativação de energia estado excitado de um filtro solar (adaptado BONDA de 2009, HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010).....	169
Figura 3. Fórmulas estruturais (enólica e cetônica) do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM), adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008.....	179
Figura 4. Fórmulas estruturais do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC), <i>trans</i> e <i>cis</i> , adaptado de PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001.....	179
Figura 5. Curvas da rutina , DSC em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento a 5,0 °C min ⁻¹ e TG em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento a 10,0 °C min ⁻¹	185
Figura 6. Curvas do EHMC , ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, DSC em atmosfera dinâmica N ₂ (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ e TG em atmosfera dinâmica N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	186
Figura 7. Curvas do BMBM , BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, DSC em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ e TG em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	187

Figura 8. Curvas da mistura simples do BMBM , BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, com o EHMC , ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (1:1), DSC em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento a 5,0 °C min ⁻¹ e TG em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	188
Figura 9. Curvas da mistura simples do EHMC , ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, e rutina (1:1), DSC razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ , razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e TG , em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	189
Figura 10. Curvas da mistura simples do BMBM , BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, e rutina (1:1), DSC , razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e TG , em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	190
Figura 11. Curvas da mistura binária do BMBM , BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, com o EHMC , ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (1:1), e da mistura ternária BMBM , EHMC e rutina , DSC razão de aquecimento 5,0 °C min ⁻¹ , sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL min ⁻¹) e TG em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min ⁻¹	192
Figura 12. Espectros ¹ H RMN do filtro EHMC antes e após irradiação UV.....	194
Figura 13. Espectros ¹ H RMN do filtro BMBM antes e após irradiação UV.....	196
Figura 14. Espectros ¹ H RMN dos filtros BMBM e EHMC antes e após irradiação UV.....	198
Figura 15. Espectros ¹ H RMN dos filtros BMBM e EHMC , adicionados de rutina , antes e após irradiação UV.....	199
Figura 16. Espectros ¹ H RMN do filtro BMBM , adicionado de rutina , antes e após irradiação UV.....	200
Figura 17. Espectros ¹ H RMN do filtro EHMC , adicionado de rutina , antes e após irradiação UV.....	201
Figura 18. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro BMBM pela rutina	203
Figura 19. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro EHMC pela rutina	203
Figura 20. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto dos filtros BMBM e EHMC combinados pela rutina	204

Capítulo 1

Quantificação simultânea por qHRMN: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol)

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A exposição excessiva a radiação solar é um problema de saúde pública. Em 2002 a Organização Mundial da Saúde elaborou uma série intitulada Saúde Escolar. O documento número sete desta série foi elaborado com informações sobre fotoproteção e afirmou que a incidência de câncer vem aumentando desde os anos 70, sendo que representa um dos três tipos diagnosticados em maior número. Adicionalmente, a diminuição da imunidade cutânea, como resultado da exposição à radiação UV, tem implicações em todo o corpo. A população mais vulnerável aos efeitos da exposição solar excessiva são as crianças e jovens que vivem em países localizados próximos a linha do Equador. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013; SILVA *et al.*, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Para reduzir os efeitos deletérios da radiação solar, países como Brasil, Austrália e Estados Unidos mantêm campanhas educativas permanentes, veiculadas por órgãos responsáveis pela saúde pública. As principais recomendações são:

- evitar a exposição excessiva à radiação ultra violeta (UV);
- utilizar chapéu com abas largas, aproximadamente 7,5 cm para proteção da face, pescoço, ouvidos e cabeça;
- usar roupas que cubram a maior parte possível do corpo;
- utilizar óculos de sol que ofereçam ação contra raios UVA e UVB para proteção dos olhos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011; UNITED STATES, 2011, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; AUSTRALIAN, 2010).

Além destes cuidados, a fotoproteção também pode ser alcançada pela utilização de formulações de uso tópico que devem promover proteção de amplo espectro, apesar de não ser a primeira linha de combate aos efeitos deletérios da radiação UV, o consumo de fotoprotetores de uso tópico está em ascensão. No Brasil este aumentou mais de 100% entre 2004 e 2009 e, segundo informações da literatura, em 2012, o país ocupou o primeiro lugar no consumo de fotoprotetores (ABIHPEC, 2012; AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011; UNITED STATES, 2011, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; AUSTRALIAN, 2010).

O estilo de vida atual, com o estímulo da prática de atividades recreativas ao ar livre, além da ampla divulgação de informações sobre os males que podem ser causados pela exposição excessiva à radiação solar, podem ter importante participação no aumento do consumo de fotoprotetores.

Atualmente, os filtros solares são encontrados em diferentes produtos de uso tópico utilizados diariamente por um grande número de pessoas. Para exercer proteção adequada, de amplo espectro, os fotoprotetores devem ter ação contra raios UVA e UVB. A composição de uma formulação fotoprotetora efetiva está baseada em moléculas orgânicas ou partículas inorgânicas ou a combinação de ambas. Os filtros orgânicos são essencialmente compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático que absorvem a radiação em diferentes regiões espectrais (UVA ou UVB) (MAIER *et al.*, 2001; BERNEBURG *et al.*, 1999; SHAATH, 1997; GIOKAS, SALVADOR & CHISVERT, 2007).

Com o intuito de promover proteção de amplo espectro, na maioria dos protetores solares, estão associados pelo menos dois filtros orgânicos, um com proteção ideal na região UVB e outro no UVA. Dois representantes de tais classes de filtros UV químicos são os cinamatos (filtro UVB), como o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e os dibenzoilmetanos (filtro UVA), como a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. Eles estão associados em várias formulações disponíveis comercialmente, mas para melhorar a fotoestabilidade a presença de um agente estabilizador é necessária, como o BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, que é um filtro ultravioleta de amplo espectro, altamente fotoestável (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

Quantificar os filtros solares em formulações fotoprotetoras é um fator importante para garantir a qualidade do produto e segurança do usuário, uma vez que as agências de regulatórias estipulam limites máximos de

concentração de uso em formulações de uso tópico e a efetividade dessas preparações é dependente de suas composições (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006; UNITED STATES 1997).

Com o objetivo de observar a estabilidade química dos filtros orgânicos, diferentes técnicas instrumentais têm sido utilizadas para qualificar e quantificar filtros UV em protetores solares. Na literatura existem relatos de determinação de filtros solares orgânicos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de Raman, e de absorção no ultravioleta-visível, (UV-Vis), cromatografia a gás, (CG) e especialmente, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006; CHISVERT, PASCUAL-MARTI & SALVADOR, 2001).

Métodos analíticos proporcionam a possibilidade de identificação e quantificação de diferentes substâncias em diversos tipos de amostras. É fundamental demonstrar, pela validação analítica, que estes conduzem a resultados confiáveis e apropriados à finalidade pretendida. Para tanto, devem apresentar especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; ICH, 2005 ;INMETRO, 2010).

Diante do exposto, este trabalho realizou a validação analítica de metodologia para avaliação e quantificação simultânea dos filtros solares ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (ρ -metoxicinamato de octila), BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (bemotrizinol) veiculados em formulações fotoprotetoras. Como metodologia inovadora foi utilizada a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a quantificação dos filtros.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FILTROS SOLARES

Os fotoprotetores são utilizados para prevenir os danos causados pela radiação solar, protegendo a pele dos efeitos adversos agudos e crônicos, que ocorrem tanto em certas condições de trabalho, como coletores de lixo, carteiros entre outros, quanto para as atividades de recreação ao ar livre. A composição de uma formulação fotoprotetora efetiva está baseada em partículas inorgânicas ou moléculas orgânicas, respectivamente filtros físicos e químicos ou a combinação de ambas. As partículas inorgânicas, representadas pelo dióxido de titânio e óxido de zinco, refletem a radiação ultravioleta e visível pela formação de um filme de partículas metálicas, que produzem uma barreira opaca. Dependendo do tamanho desta partícula, a fotoproteção pode ocorrer por reflexão e/ou absorção da radiação UV. Os filtros orgânicos são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV e transformá-la em radiações com energias de menor intensidade ou calor, inofensivas ao ser humano. (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; FLOR, DAVOLOS & CORRÊA, 2007).

A utilização de princípios ativos em produtos fotoprotetores diferem, consideravelmente, em todo o mundo variando, também, o nível máximo permitido entre as agências reguladoras, apresentadas no **Quadro 1** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Comunidade Européia e Austrália (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

INCI*	IUPAC*	INN*	Substância*	Localização Concentração máxima %			
				CE*	EUA†	AUS‡	BRA•
FILTRO UVB							
Derivados de PABA							
PABA	4-aminobenzoic acid		acido 4-aminobenzoico	5,0	15,0	15,0	15,0
ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA	2-ethylhexyl 4-(dimethylamino) benzoate	padimate-O	4-dimetil-aminobenzoato de 2- etilhexila	8,0	8,0	8,0	8,0
PEG-25 PABA			n-etoxi-e-4-aminobenzoato de etila	10,0		10,0	10,0
ETHYLHEXYL TRIAZONE	benzoic acid, 4,4',4''-(1,3,5-triazine-2,4,6- trilyltriimino)tris-,tris(2-ethylhexyl) ester; octyl triazone		2, 4, 6-trianilin-(p-carbo-2'- etil-hexil-1'-oxi)-1, 3, 5- triazina	5,0		5,0	5,0
Cinamatos							
ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE	2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate	octinoxate	4-metoxicinamato de 2--etilhexila	10,0	7,5	10,0	10,0
CINOXATE	2-propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethoxyethyl ester	cinoxate	4-metoxicinamato de 2-etoxietila		3,0	6,0	3,0
ISOAMYL P-METHOXYCINNAMATE	isopentyl p-methoxycinnamate	amiloxate	Metoxicinamato de isopentila	10,0		10,0	10,0
Salicilatos							
ETHYLHEXYL SALICYLATE	2-ethylhexyl salicylate	octisalate	salicilato de 2-etilhexila	5,0	5,0	5,0	5,0
HOMOSALATE	benzoic acid, 2-hydroxy-, 3,3,5- trimethylcyclohexyl ester	homosalate	salicilato de homomentila	10,0	15,0	15,0	15,0
TEA-SALICYLATE	salicylic acid, compound with 2,2',2''- nitrioltriethanol (1:1)	trolamine salicylate	salicilato de trietanolamina		12,0	12,0	12,0

Legenda: **INCI** = International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; **IUPAC** = International Union of Pure and Applied Chemistry; **INN** = International Non-proprietary Name; **CE** = Comunidade Européia; **EUA** = Estados Unidos da América; **AUS** = Austrália; **BRA** = Brasil; *Lista de filtros UV permitidos no Conselho Diretivo do Comitê Europeu; † Lista de filtros UV listados no FDA; ‡ Lista de filtros UV listados pelo Guia Regulatório para medicamentos da Austrália, TGA; • Lista de filtros UV permitidos conforme Resolução RDC n.48 da ANVISA, 2006.

Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Comunidade Européia e Austrália (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

INCI*	IUPAC*	INN*	Substância*	Localização Concentração máxima %			
				CE*	EUA†	AUS‡	BRA●
FILTRO UVB							
Canforas							
BENZYLIDENE CAMPHOR SULFONIC ACID	alpha-(2-Oxoborn-3-ylidene) toluene-4 sulphonic acid		3-benzilideno cânfora	6,0			6,0
POLYACRYLAMIDOMETHYL BENZYLIDENE CAMPHOR			polimero de n-{(2 e 4) [(2-oxoborn-3-ilideno)metil]benzil}acrilamida	6,0			6,0
CAMPHOR BENZALKONIUM METHOSULFATE	methyl N,N,N-trimethyl-4-[(4,7,7-trimethyl-3-oxobicyclo[2.2.1]hept-2-ylidene) methyl]anilinium sulphate;		sulfato de metila de N, N, N-trimetil-e-(2, oxoborn-3-ilidenometil) anilínio	6,0		6,0	6,0
4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR	1,7,7-trimethyl-3-[(4-methylphenyl)methylene]bicyclo[2.2.1]heptan-2-one	enzacamene	3-(4'- metilbenzilideno)-d-l-cânfora	4,0		4,0	4,0
3-BENZYLIDENE CAMPHOR	1,7,7-trimethyl-3-(phenylmethylene) bicyclo[2.2.1]heptan-2-one		3-benzilideno cânfora	2,0			2,0
Outros							
OCTOCRYLENE	2-propenoic acid, 2-cyano-3,3-diphenyl-, 2-ethylhexyl ester	octocrilene	2-ciano-3,3'-difenilacrilato de 2etilhexila	10,0	10,0	10,0	10,0
PHENYLBENZYMIDAZOLE SULFONIC ACID	2-Phenyl-1H-benzimidazole-5-sulphonic acid	ensulizole	ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico	8,0	4,0	4,0	8,0

Legenda: **INCI** = International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; **IUPAC** = International Union of Pure and Applied Chemistry; **INN** = International Non-proprietary Name; **CE** = Comunidade Européia; **EUA** = Estados Unidos da América; **AUS** = Austrália; **BRA** = Brasil; *Lista de filtros UV permitidos no Conselho Diretivo do Comitê Europeu; † Lista de filtros UV listados no FDA; ‡ Lista de filtros UV listados pelo Guia Regulatório para medicamentos da Austrália, TGA; ● Lista de filtros UV permitidos conforme Resolução RDC n.48 da ANVISA, 200.

Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Comunidade Européia e Austrália (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

INCI*	IUPAC*	INN*	Substância*	Localização Concentração máxima %			
				CE*	EUA†	AUS‡	BRA●
FILTRO UVA							
Benzofenonas				CE*	EUA†	AUS‡	BRA●
BENZOPHENONE-3	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone	oxybenzone	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona	10,0			
BENZOPHENONE-4	5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzenesulfonic acid	sulisobenzone	ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5	5,0	10,0	10,0	10,0
BENZOPHENONE-5	benzenesulfonic acid, 5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxy-, monosodium salt	sulisobenzone sodium		5,0			5,0
BENZOPHENONE-8	2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone; dioxybenzone	dioxybenzone	2, 2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona		3,0	3,0	3,0
Outros							
MENTHYL ANTHRANILATE	menthyl anthranilate	meradimate	antranilato de mentila		5,0	5,0	5,0
BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE	1-[4-(1,1-Dimethylethyl)phenyl]-3-(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione	avobenzone	1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil) propano-1, 3-diona	5,0	3,0	5,0	5,0
METHYLENE BIS-BENZOTRIAZOLYL TETRAMETHYLBUTYLPHENOL	2,2'-methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl phenol)	bisotrizole	2,2'-metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol metileno bis-benzotriazolil tetraetil butil fenol	10,0		10,0	10,0
DROMETRIZOLE TRISILOXANE	phenol,2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-methyl-6-(2-methyl-3-(1,3,3,3-tetramethyl-1-(trimethylsilyl)oxy)-disiloxanyl)propyl		2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)-disiloxanil)propil)fenol	15,0		15,0	15,0

Legenda: INCI = International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry; INN = International Non-proprietary Name; CE = Comunidade Européia; EUA = Estados Unidos da América; AUS = Austrália; BRA = Brasil; *Lista de filtros UV permitidos no Conselho Diretivo do Comitê Europeu; † Lista de filtros UV listados no FDA; ‡ Lista de filtros UV listados pelo Guia Regulatório para medicamentos da Austrália, TGA; ● Lista de filtros UV permitidos conforme Resolução RDC n.48 da ANVISA, 2006.

Quadro 1. Relação de filtros solares aprovados no Brasil, Estados Unidos, Comunidade Européia e Austrália (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

INCI*	IUPAC*	INN*	Substância*	Localização Concentração máxima %			
				CE*	EUA†	AUS‡	BRA●
FILTRO UVA							
Outros				CE*	EUA†	AUS‡	BRA●
DISODIUM PHENYL DIBENZIMIDAZOLE TETRASULFONATE	1H-benzimidazole-4,6-disulfonic Acid, 2,2'-(1,4-phenylene) bis-, disodium salt;	bisdisulizole disodium	sal monosódico do ácido 2,2'-bis-(1,4- fenileno)- 1H-benzimidazol-4,6-dissulfônico	10,0		10,0	10,0
TEREPHTHALYLIDENE DICAMPOR SULFONIC ACID	3,3'-(1,4-phenylenedimethylene) bis [7,7-dimethyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1] heptane-1-methanesulfonic acid]	ecamsule	3, 3'-(1, 4-fenilenodimetileno)bis (ácido 7, 7-dimetil-2-oxo-biciclo-(2.2.1)1- heptilmetanosulfônico e seus sais	10,0	10,0	10,0	10,0
DIETHYLHEXYL BUTAMIDO TRIAZONE	benzoic acid, 4,4'-[[6-[[4-[[[(1,1- dimethylethyl)amino] carbonyl]phenyl]amino]-1,3,5- triazine-2,4-diyl]diimino]bis -bis(2- ethylhexyl) ester	iscotrizinol	ácido benzóico,4,4'-[[6-[[4-[[[(1,1-dimetiletil) amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina- 2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etilhexil)	10,0			10,0
POLYSILICONE-15			dimeticodietilbenzalmalonato	10,0		10,0	10,0
BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE	2,2'-[6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5- triazine-2,4-diyl]bis[5-[(2- ethylhexyl)oxy]-phenol]	bemotrizinol	(1,3,5)-triazina-2,4-bis{[4-(2-etil-hexiloxi)-2- hidróxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil)	10,0		10,0	
DIETHYLAMINO HYDROXYBENZOYL HEXYL BENZOATE	benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2- hydroxybenzoyl]-hexylester		éster helílico do ácido 2-[4-(dietilamino)-2- hidroxibenzoil]-,benzóico	10,0			10,0
FILTROS INORGÂNICOS							
TITANIUM DIOXIDE	titanium dioxide	titanium dioxide	dióxido de titânio	25,0	25,0	25,0	25,0
ZINC OXIDE	zinc oxide	Zinc oxide	óxido de zinco		25,0	SEM LIMITE	25,0

Legenda: INCI = International Nomenclature of Cosmetic Ingredients; IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry; INN = International Non-proprietary Name; CE = Comunidade Européia; EUA = Estados Unidos da América; AUS = Austrália; BRA = Brasil; *Lista de filtros UV permitidos no Conselho Diretivo do Comitê Europeu; † Lista de filtros UV listados no FDA; ‡ Lista de filtros UV listados pelo Guia Regulatório para medicamentos da Austrália, TGA; ● Lista de filtros UV permitidos conforme Resolução RDC n.48 da ANVISA, 2006.

Os cinamatos representam uma classe importante de filtros solares com proteção UVB, dentre eles se destaca o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC), no entanto os dibenzoilmetanos atuam na proteção UVA e são representados, principalmente, pelo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM). Esta combinação de filtros promove proteção de amplo espectro e são associados em diversas formulações disponíveis comercialmente, mas para promover a fotoestabilidade desta combinação é necessária a adição de um fotoestabilizador como BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT) (DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006).

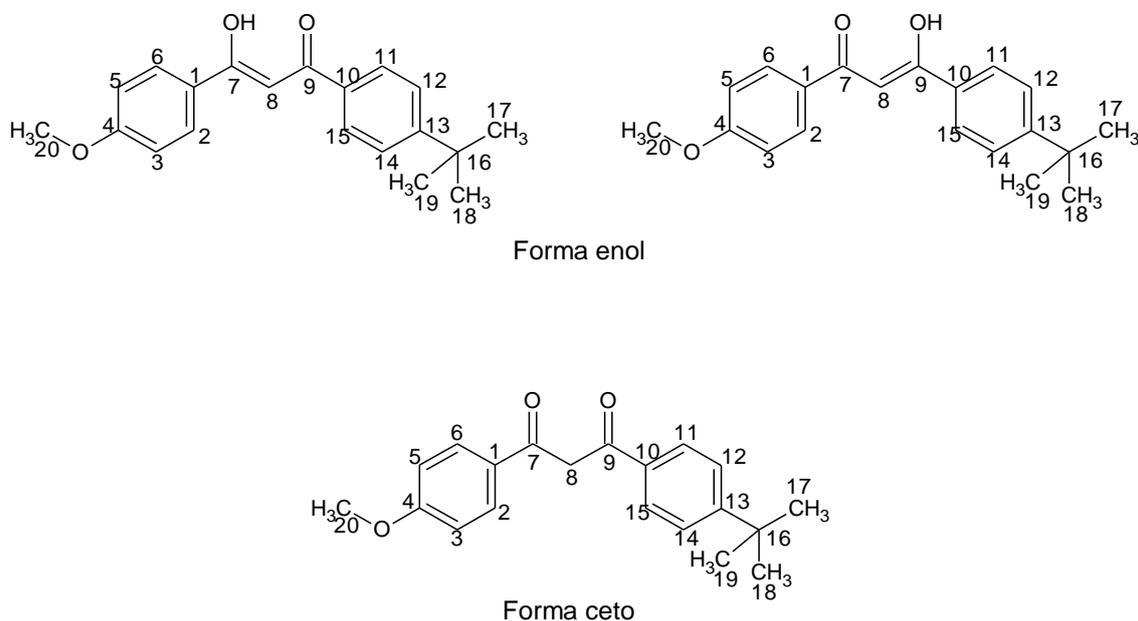
2.1.1 BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM)

Em contraste com a ampla disponibilidade de substâncias com ação de filtros UVB, os do tipo UVA efetivos são reduzidos e, entre eles, o BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE é, provavelmente, o representante mais empregado em formulações fotoprotetoras (farmacêuticas e cosméticas). Possui absorção máxima entre 340 e 365 nm, dependendo do solvente utilizado (PARIS, *et al.*, 2009; MTURI & MARTINCIGH, 2008). Este filtro também é conhecido como avobenzona, segundo a nomenclatura INN.

O BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE é uma molécula β -dicetona e, por este motivo, está em equilíbrio tautomérico na forma ceto-enol, **Figura 1**. A tendência deste equilíbrio pode ser afetada pela variação da temperatura, do solvente e da concentração. A forma “ceto” ocorre somente em uma forma geométrica enquanto a “enol” ocorre em diferentes configurações (PARIS, *et al.*, 2009, MTURI & MARTINCIGH, 2008, SHWEITZER & BENSON, 1968).

A **Figura 1** representa a molécula do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE na forma cetônica e enólica.

Figura 1. Estrutura química da molécula da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM) na forma cetônica e enólica, adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008.



Em formulações fotoprotetoras, o BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE existe predominantemente na forma enólica e é nessa configuração que a molécula absorve a radiação na região UVA, entre 340 e 365 nm. Em solução ou na forma de filme fino, ocorre sua fototautomerização para forma cetônica, ocorrendo grande perda da absorção. A forma cetônica absorve na região UVC, entre 260 e 280 nm (PARIS, *et al.*, 2009; MTURI & MARTINCIGH, 2008).

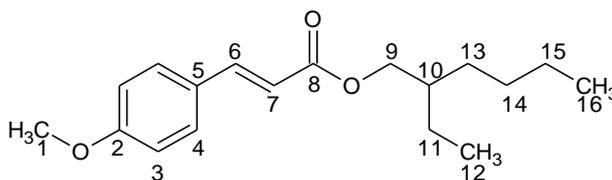
Em 1997, o FDA aprovou a comercialização de fotoprotetores contendo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE na concentração máxima de 3%, isoladamente, ou de 2 a 3% em combinações com outros filtros como: CINOXATE; ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE; BENZOPHENONE-3; HOMOSALATE; OCTOCRYLENE; ETHYLHEXYL SALICYLATE; BENZOPHENONE-4 e/ou TEA-SALICYLATE. Reconhecendo que os produtos que contém a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE sozinho nas concentrações previstas e/ou em combinações com os filtros da categoria dos cinamatos, benzofenonas, salicilatos e/ou o difenilacrilatos são considerados

como seguros e eficazes. No entanto, no estudo realizado por Dondi e colaboradores (2006), sobre a interação entre diferentes filtros UVA/UVB utilizados em formulações comerciais de fotoprotetores, o *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE* e o *BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE* apresentaram reação fotoquímica irreversível em solventes apolares e em emulsões, como fotocicloadição com a produção de dímeros de cinamatos e fotoprodutos de ciclobutilcetonas que subsequentemente são fragmentados (DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006; UNITED STATES 1997).

2.1.2 *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC)*

O *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE*, **Figura 2**, é um filtro solar amplamente utilizado em vários produtos fotoprotetores devido seu amplo coeficiente de extinção na região UVB em diversos solventes, aproximadamente $22000\text{--}24000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, a 310nm. Quando exposto à radiação UV, apresenta diminuição da fotoproteção, pois pode ocorrer isomerização. Poucas reações de fotosensibilização e/ou fotoalergênica foram registradas na literatura (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001; MAIER *et al.*, 2001). Também é conhecido como metoxicinamato de octila, *p*-metoxicinamato de octila e octinoxate, pela nomenclatura INN.

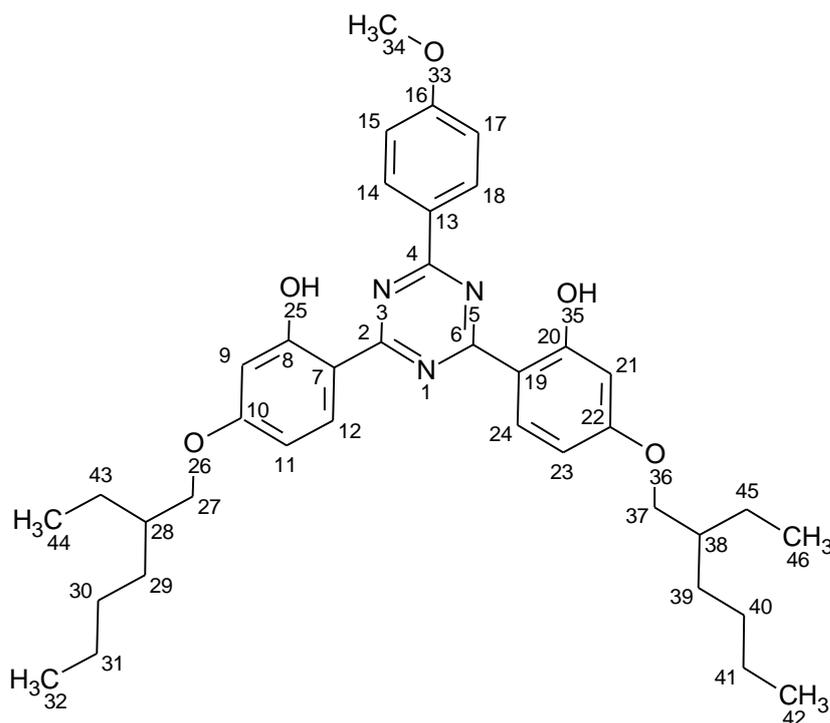
Figura 2. Fórmula estrutural do *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE* (EHMC) adaptado de PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001.



2.1.3 BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT)

O BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT), **Figura 3**, é derivado da triazina que, recentemente, está sendo utilizado como filtro solar de amplo espectro. É lipossolúvel com absorção máxima a 310 (UVB) e 343 nm (UVA) e, por apresentar essa característica, é considerado de amplo espectro. É fotoestável e pode promover a fotoestabilidade da combinação do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE com o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (DENCAUSSE, *et al.*, 2008; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; CHATELAIN & GABARD, 2001). Conhecido como bemotrizinol, segundo a nomenclatura INN.

Figura 3. Fórmula estrutural do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT), adaptado de DENCAUSSE, *et al.*, 2008.



2.2 ESPECTROSCOPIA DE RMN QUANTITATIVA (qRMN)

A qRMN é uma técnica que permite a determinação quantitativa de diversos grupos moleculares, possibilitando a validação de metodologia analítica com precisão e exatidão adequadas, mesmo para amostras complexas, como formulações cosméticas, representando importante técnica no meio acadêmico e na área de pesquisa industrial (BATISTA *et al.*, 2008; DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006).

A RMN é, por definição, uma técnica espectroscópica quantitativa uma vez que o sinal da ressonância é diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes. Este fato permite, em princípio, uma determinação precisa do número de estruturas moleculares, e conseqüentemente, de substâncias presentes em meio sólido ou líquido (GADAPE & PARIKH, 2011; MALZ, 2008; MALZ & JANCKE, 2005).

Segundo a literatura, os primeiros pesquisadores que desenvolveram trabalhos de quantificação utilizando a espectroscopia de RMN foram Jungnickel & Forbes em 1963, que realizaram a quantificação de diferentes átomos de hidrogênio por integração da intensidade da ressonância magnética. No mesmo ano, Hollis, quantificou substâncias como o ácido acetilsalicílico, a fenacetina e a cafeína em misturas, por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (MALZ, 2008; JUNGNICHEL & FORBES, 1963; HOLLIS, 1963).

A RMN quantitativa (qRMN) tem sido aplicada em diversas áreas, apresentando como vantagens específicas: possibilidade de determinação de estruturas em nível molecular; na determinação de razões não existe a necessidade de calibrações de intensidade (a área do sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos); o tempo de análise é reduzido; o caráter não destrutivo da amostra; não necessita de separação prévia do analito em uma mistura; e a possibilidade de determinação de mais de uma substância simultaneamente. Sendo que a principal vantagem em relação a cromatografia líquida seria a redução da utilização de solventes, simplificação do método de

análise. Esta técnica possibilita a utilização de somente um padrão de calibração para múltiplos analitos, promovendo conveniência experimental, além de, fornecer informações relevantes sobre interações entre as substâncias estudadas (MALZ & JANCKE, 2005, WELLS *et al.*, 2002).

2.2.1 MÉTODO RELATIVO

Por meio do método relativo, a espectroscopia de qRMN permite determinar a razão entre os analitos avaliados. A relação fundamental em qRMN é que a resposta do sinal (área do sinal integrado) em um espectro é diretamente proporcional ao número de núcleos, gerando a linha de ressonância correspondente, **Equação 1** (HOLZGRABE *et al.*, 2005).

$$I_x = K_s \times N_x$$

Equação 1. Cálculo da área do sinal integrado em qRMN

Onde: I_x é a área do sinal integrado, K_s é uma constante espectrométrica, N_x representa o número relativo de spins que causam esta ressonância.

Em experimentos de RMN com configurações corretas dos parâmetros, todas as moléculas estão sob as mesmas condições experimentais. Neste caso, K_s é cancelado e as reações de intensidade do espectro estão relacionadas, diretamente, com os números de núcleos locais (deslocamentos químicos diferentes), de acordo com **Equação 2**.

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1}{N_2}$$

Equação 2. Relação da intensidade do espectro e número de núcleos locais

A quantificação apenas é possível com sinais integrados separados. Caso esta condição não ocorra, ela pode ser acessada com a alteração do tipo de solvente, do valor de pH ou pela adição de reagentes auxiliares. A sobreposição de sinais de hidrogênio de compostos que exibem a mesma resposta pode ser corrigido pela subtração das integrais calculadas. Sinais

sobrepostos de hidrogênios de compostos isoméricos não podem ser utilizados para a quantificação. A temperatura, também, pode influenciar na separação dos sinais e, devido a este fato, deve ser controlada (HOLZGRABE *et al.*, 2005).

A razão molar de dois componentes x e y pode ser calculada diretamente usando a **Equação 3**.

$$\frac{n(x)}{n(y)} = \frac{I(x)}{I(y)} \times \frac{N(y)}{N(x)}$$

Equação 3. Razão molar pelo método relativo em qRMN

Onde: $n(x)$ e $n(y)$ são, respectivamente, número de moles de X e de Y. $I(x)$ e $I(y)$ a área do sinal integrado de X e de Y. $N(x)$ e $N(y)$ spins de X e de Y (MALZ, 2008).

Conseqüentemente, a fração de um componente x em uma mistura m é dada pela **Equação 4**, independente do sinal do solvente na qual a mistura é dissolvida:

$$\frac{n(x)}{\sum_{i=1}^m n(i)} = \frac{I(x)/N(x)}{\sum_{i=1}^m I(i)/N(i)} \times 100\%$$

Equação 4. Cálculo da fração de um componente em uma mistura, por qRMN

A qNMR é o método mais importante para quantificar a razão molar de isômeros, diastômeros e enantiômeros, devido a excelente seletividade como análise estrutural combinada as vantagens de ser um procedimento fácil e rápido de quantificação. O conhecimento das massas molares não é requerido. Enantiômeros, embora tenham espectros idênticos, podem ser diferenciados por RMN, quando são usados solventes quirais ou agentes complexantes (MALZ & JANCKE, 2005).

A concentração da substância pode ser calculada diretamente utilizando-se um padrão interno conhecido, **Equação 5** (MALZ, 2008; BATISTA *et al.*, 2008; WELLS *et al.*, 2002).

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

Equação 5. Cálculo para obtenção da concentração da substância pelo método absoluto qRMN

Onde : **m(a)** - massa do analito; **m(PI)** - massa do padrão interno; **A(a)** - área do sinal do analito; **A(PI)** - área do sinal do padrão interno; **N(PI)** - número de núcleos hidrogênicos presentes no sinal do padrão interno; **N(a)** - número de núcleos de hidrogênios presentes no sinal do analito; **M(a)** - massa molar do analito; **M(PI)** - massa molar do padrão interno; **(PI)** - pureza do padrão interno (MALZ, 2008; BATISTA *et al.*, 2008; WELLS *et al.*, 2002).

Nos últimos anos diversos pesquisadores desenvolveram métodos para a quantificação de diferentes substâncias em formulações farmacêuticas baseados em qRMN. O interesse na técnica é evidenciado pela elevação no número de publicações, mais de 170 referências publicadas entre 2004 e 2011 (PAULI *et al.*, 2012).

A seguir estão descritos alguns trabalhos que utilizaram o qRMN para quantificação de substâncias na área farmacêutica.

No trabalho desenvolvido por Shamsipur e colaboradores (2002), a qRMN foi aplicada para determinar a ampicilina e seus subprodutos em amostras biológicas, o ácido 6-aminopenicilina e a fenilglicina. O espectrômetro foi operado na frequência do hidrogênio a 500,13 MHz, com uma sonda de prótons de 5 mm. Os espectros foram obtidos em meio ácido. Os parâmetros empregados foram: tempo de aquisição de 1,6 s; largura da banda espectral de 10330,578 Hz; ângulo de 30°; relaxação de 2 s e temperatura de 25 °C. A extensão dos pulsos para ¹HRMN foi de 6,9 μs. A resolução foi 18 e a

supressão de água foi realizada utilizando uma sequência de pulso a 3-9-19 para a análise da amostra biológica. Para a quantificação foi utilizado o ácido maleico como padrão interno. A linearidade foi verificada de 1,0 a 50 mg mL⁻¹ para a ampicilina; de 0,5 a 10 mg mL⁻¹ para a 6-aminopenicilina e para a fenilglicina. O coeficiente de correlação resultante foi, respectivamente 0,997; 0,995 e 0,995. Os limites de detecção foram de 80,0 µg mL⁻¹, 160,0 µg mL⁻¹ e 90,0 µg mL⁻¹. A comparação deste método com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) não revelou diferença estatisticamente significativa com limite de confiança de 95% e o autor ressalta que o qRMN foi mais seletivo, simples e rápido comparado ao CLAE.

Zoppi, Linares & Longhi (2005) determinaram quantitativamente o maleato de enalapril em preparações farmacêuticas. A l-leucina foi empregada como padrão interno. Os espectros de ¹H foram obtidos a 200 MHz, utilizando como solvente D₂O. A precisão foi verificada pela recuperação de padrão adicionado à amostra e o resultado obtido para nove amostras avaliadas foi 99,5% com desvio padrão de 1,54. Neste trabalho foram analisadas amostras comerciais e os resultados foram comparados com o método da Farmacopéia Americana edição 24, avaliando-se as amostras por CLAE. Os resultados obtidos foram 98,3 a 98,8% do conteúdo declarado, quando as amostras foram avaliadas por qRMN e 99,7 a 104,0% por CLAE. Os autores concluíram que o método foi seletivo, simples e rápido comparado ao CLAE.

O miconazol, o metronidazol e o sulfametoxazol foram quantificados em formas farmacêuticas e em amostras de urina por um método quantitativo ¹H qRMN, utilizando como padrão interno o ácido maleico; amplitude de 6009,6 Hz e tempo de aquisição de 5,453 s. O tempo de relaxação foi de 2,55 s. O padrão interno de referência de deslocamento químico foi o tetrametilsilano (TMS, δ = 0,0). A sonda foi mantida a temperatura de 25 °C. O

solvente selecionado foi DMSO- d_6 . A linearidade foi avaliada entre 0,6 e 172,38 mg mL⁻¹ para o miconazol e 0,5 e 231,40mg mL⁻¹ para o metronidazol; e 0,5 e 155,8 mg mL⁻¹ para o sulfametazol, resultando no coeficiente de correlação igual a 1 para os três princípios ativos e recuperação de 97,54 a 102,83%, para os dois tipos de amostras. A determinação da recuperação em formas farmacêuticas foi: 97,50 a 98,34%; 96,34 a 98,15% e 98,41 a 101,33% para o miconazol; o metronidazol; e o sulfametazol, respectivamente. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os métodos qRMN e CLAE. A análise da urina contendo diferentes concentrações de metronidazol e de sulfametazol foram avaliadas e os resultados da recuperação foram, respectivamente: 94,50 a 97,80% e de 99,10 a 103,80%. Analisaram-se, também, soluções com: misturas das três substâncias, das formas farmacêuticas e das substâncias em amostras de urina. Obteve-se a valores de recuperação na mistura das três substâncias de 94,4 a 101,70% e das formas farmacêuticas de 94,56 a 104,87%. A mistura dos três princípios ativos na urina resultou em 93,40 a 103,20% de recuperação (SALEM, MOSSA & BARSOUM, 2006).

Batista e colaboradores (2008) desenvolveram um método quantitativo para a determinação do dimetilaminoetanol em formulações cosméticas utilizando a qRMN. O solvente utilizado foi o DMSO- d_6 , os espectros foram obtidos operando-se o espectrômetro na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz com uma sonda multinuclear de 5mm, pulso 30°, com tempo de aquisição de 5 μ s e relaxação de 10 s. O padrão de deslocamento químico de referência foi o tetrametilsilano (TMS, $\delta=0,0$), a temperatura foi 25 °C e o padrão interno selecionado foi o ácido maleico. Neste trabalho, os autores determinaram quantitativamente o dimetilaminoetanol e seus sais, o bitartarato de dimetilaminoetanol e o benzoato acetamido de dimetilaminoetanol. A linearidade foi observada no intervalo 10 e 30 mg; coeficiente de correlação

0,9970 a 0,9985; limites de quantificação 5,1 a 7,1 mg mL⁻¹ e a recuperação de 100,7 a 104,0%.

A validação de um método para quantificação de pioglitazona em formas farmacêuticas foi realizada por Gadape & Parikh (2011). Os espectros foram obtidos operando-se o espectrômetro a 300,13 MHz e sonda de 5mm, utilizando o ácido maleico como padrão interno. O solvente utilizado foi o DMSO-*d*₆; pulso de 30°; banda espectral de 6172,839 Hz; pré-aquisição de 6 μs e tempo de aquisição de 2,654 s. O deslocamento químico interno de referência foi o sinal residual do dimetilsulfóxido. Avaliaram-se os resultados de linearidade (7,0 a 15,0 mg) e o coeficiente de correlação foi 0,9983. A especificidade foi verificada por meio do estudo de um placebo, e os sinais do analito e do padrão interno não tiveram interferências dos componentes da formulação. Os resultados obtidos para precisão e exatidão foram, respectivamente, 0,6 e 97,98%. Os limites de detecção e quantificação foram 0,48 mg 1,48mg mL⁻¹.

A relevância da técnica e as vantagens descritas por diferentes pesquisadores justificam a escolha método qRMN para a quantificação simultânea dos filtros BMBM, EHMC e BEMT utilizados nesse trabalho, buscando uma proposta analítica inovadora.

2.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO

A importância do tema fotoproteção fez com que diversos pesquisadores desenvolvessem diferentes metodologias para a quantificação simultânea de diferentes tipos de filtros solares químicos veiculados em formulações de uso tópico utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esta é, sem dúvida, a técnica mais empregada na quantificação de filtros solares orgânicos veiculados em formulações fotoprotetoras e pode ser utilizado como referência no desenvolvimento de novas metodologias (CHAWLA & MRIG, 2009; DENCAUSSE *et al.* 2008; KEDOR-HACKMANN *et*

al, 2006; SALVADOR, DE LA OSSA & CHISVERT; 2003; CHISVERT, PASCUAL-MARTI & SALVADOR, 2001; DINUNZIO & GADDE, 1990).

Nos parágrafos seguintes foram relacionados alguns trabalhos publicados que utilizaram o CLAE como método para a quantificação de diferentes filtros UV para ilustrar a metodologia e, principalmente, fornecer informações sobre os resultados obtidos.

Em 1990, Dinunzio & Gadde, desenvolveram uma metodologia que empregou como fase estacionária uma coluna C₁₈; fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra injetada de 5 a 15 µL, e detecção no ultravioleta (UV) a 313 nm. O tetraidrofurano foi empregado como fase móvel para a quantificação simultânea dos filtros BENZOPHENONE-3, ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA, MENTHYL ANTHRANILATE, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, ETHYLHEXYL SALICYLATE e OCTOCRYLENE, sendo que a linearidade foi avaliada nas concentrações de 237 a 714 ng mL⁻¹; 41 a 1235 ng mL⁻¹; 42 a 1279 ng mL⁻¹; 286 a 861 ng mL⁻¹; 195 a 587 ng mL⁻¹ e 435 a 1307 ng mL⁻¹, respectivamente. O coeficiente de correlação para todos os filtros foi maior de 0,99. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo da análise de nove amostras. A avaliação do ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA, do OCTOCRYLENE e do ETHYLHEXYL SALICYLATE resultou, respectivamente, em 1,1; 1,0 e 0,7%; os filtros BENZOPHENONE-3, MENTHYL ANTHRANILATE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE foram analisados por dezesseis amostras resultando em, respectivamente, 0,8; 3,4 e 0,9% de desvio padrão relativo. A exatidão foi avaliada pela adição de soluções do analito a produtos placebos, obtendo-se como resposta recuperação entre 98,4 ± 1,5 e 100,7±0,7%.

Chisvert, Pascual-Marti & Salvador (2001) validaram um método analítico utilizando a CLAE para quantificar simultaneamente seis filtros solares orgânicos em formulações fotoprotetoras: BENZOPHENONE-4, BENZOPHENONE-3, ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, ETHYLHEXYL SALICYLATE e HOMOSALATE. Foram empregadas como fase estacionária uma coluna C₁₈; fase móvel etanol, água e ácido acético (70:29,5:0,5); e fluxo de 0,5 mL/min. A detecção foi no UV

a 313 nm. O tempo de corrida foi 25 minutos e os limites de detecção foram de 0,2 a 2,0 mg L⁻¹, exceto para a BENZOPHENONE-4, que foi 20 mg L⁻¹. A exatidão para todos os filtros foi 96 a 101% e o desvio padrão relativo foi abaixo de 5,0%.

Salvador, De La Ossa & Chisvert (2003) determinaram quantitativamente os filtros BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, BENZOPHENONE-3, ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE em batons, baseado na dissolução das amostras em etanol-água (70:30, v/v) e agitação em banho de ultrassom. As amostras foram avaliadas por CLAE, nas condições: fase estacionária coluna C₁₈; fase móvel isocrática etanol:água:ácido acético (70:29,5:0,5; v/v/v); fluxo de 1 mL min⁻¹; e o volume de injeção de 20 µL. A detecção foi a 309 nm. A linearidade foi avaliada entre 5 e 160 µg mL⁻¹ para a BENZOPHENONE-3 e o ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA; e entre 9 e 210 µg mL⁻¹ para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, com coeficiente de correlação maior que 0,999 para todas as substâncias avaliadas. O limite de detecção estimado foi 1,5 µg mL⁻¹ para a BENZOPHENONE-3; 7 µg mL⁻¹ para a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; 1,4 µg mL⁻¹ para o ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA; e 2,7 µg mL⁻¹ para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE. A precisão do método foi 2,2% para a benzofenona-3; 2,4% para ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA; 1,9% para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e 1,8% para a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. A exatidão do método foi verificada pelo método de adição do padrão e os resultados foram: 97,0 a 101,0% para a BENZOPHENONE-3; 97,0 a 104,0% para a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; 98,0 a 103,0% para ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA; e 97,0 a 103,0% ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE.

Kedor-Hackmann e colaboradores (2006) desenvolveram um método analítico para quantificação simultânea de BENZOPHENONE-3, BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, ETHYLHEXYL SALICYLATE e HOMOSALATE em formulações de uso tópico. O sistema cromatográfico líquido era constituído por uma fase móvel de

acetonitrila:água (10:90 v/v) e outra por acetonitrila:água (90:10 v/v); fluxo de 1,0 mL min⁻¹; e detecção no UV a 310 nm. A separação foi obtida com duas colunas de fase reversa conectadas em série. O coeficiente de correlação para todos os filtros avaliados apresentou resultado entre 0,9961 e 0,9997; a recuperação foi entre 98,5 a 99,4% e desvio padrão de 1,07 e 2,44%. Os excipientes avaliados não interferiram na análise.

Com o objetivo de avaliar o efeito do material de acondicionamento na estabilidade de emulsões fotoprotetoras Santoro e colaboradores, 2004, desenvolveram e validaram método analítico, utilizando CLAE, para a quantificação simultânea de ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BENZOPHENONE-3. As condições analíticas aplicadas foram: fase estacionária coluna Li Chrospher[®] 100 RP-18, Merck[®]; fase móvel metanol:água (87:13 v/v); fluxo de 1,0 mL min⁻¹; detecção no UV a 290 nm; e temperatura de 25±1 °C. A linearidade foi verificada de 4,0 a 18,0 µg mL⁻¹ para a BENZOPHENONE-3 e 8,0 a 36,0 µg mL⁻¹ para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, com coeficiente de correlação maior que 0,999 para as duas substâncias. Os limites de detecção e quantificação determinados para a BENZOPHENONE-3 foram, respectivamente, 0,11 e 0,38 µg mL⁻¹. Para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 0,59 e 1,98 µg mL⁻¹. A precisão (desvio padrão relativo) foi 0,58 para a BENZOPHENONE-3 e 0,45 para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE. A Exatidão (porcentagem de recuperação) foi 01,88 e 98,28% para a BENZOPHENONE-3 e o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, respectivamente.

Dencausse e colaboradores (2008) quantificaram simultaneamente o BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, a BENZOPHENONE-3, a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE utilizando a CLAE, empregando como padrão interno ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA; fase estacionária uma coluna RP-18 Nucleodur[®] Gravity[®]; fase móvel tetraidrofurano, acetonitrila e solução aquosa de ácido acético; fluxo de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 10,0 µL. A aquisição dos cromatogramas foi feita em 3D entre 210 e 400 nm. A

especificidade do método foi avaliada comparando-se os resultados da matriz isenta dos filtros UV e uma solução dos filtros sem a matriz. O resultado da análise do cromatograma da matriz isenta dos filtros indicou que não houve resposta no tempo de retenção dos filtros analisados e do padrão interno. A linearidade foi avaliada na concentração de 119,0 a 305,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo-se coeficientes de correlações acima de 0,99. A precisão do método apresentou resultados abaixo de 3% para todas as substâncias avaliadas e a exatidão do método foi avaliada pela recuperação, com limites de aceitação aproximado de 15% para todos os filtros analisados.

A análise dos resultados da quantificação dos filtros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência comprovou a eficiência e adequação desta metodologia para esta finalidade.

Outra técnica empregada com sucesso para a quantificação de filtros UV veiculados em formulações de uso tópico é a espectroscopia de absorção no UV.

Chawla & Mrig, 2009, quantificaram, simultaneamente, a BENZOPHENONE-3 e o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE em formulações fotoprotetoras por meio da espectrofotometria derivada de segunda ordem, de ordem zero e comparou os resultados com a CLAE. A linearidade foi avaliada no intervalo de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as duas substâncias quando avaliadas por CLAE e de 0,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando avaliadas por espectrofotometria UV. Os resultados obtidos para o método de espectrofotometria UV de ordem zero para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE foram: coeficiente de correlação linear 0,9999; limite de detecção e de quantificação 0,6224 e 2,0748 mg mL^{-1} , respectivamente. A análise da BENZOPHENONE-3 pelo método UV de ordem zero apresentou os seguintes resultados: coeficiente de correlação linear 0,9999; limite de detecção e de quantificação de 0,6817 e 2,2723 mg mL^{-1} , respectivamente. Os dados que resultaram da análise por espectrofotometria derivada de segunda ordem para o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE foram: coeficiente de correlação linear 0,9858; limite de detecção e de quantificação 2,6583 e 8,8613 mg mL^{-1} , respectivamente. A análise da BENZOPHENONE-3 por

espectrofotometria de segunda ordem gerou os seguintes resultados: coeficiente de correlação linear 0,9999, limite de detecção e quantificação 0,6080 e 2,0266 mg mL⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos foram validados pelo método CLAE, que utilizou como fase móvel isocrática metanol:água (88:12), e coluna Spherisorb® ODS2. A quantificação dos filtros gerou os seguintes resultados: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE: tempo de retenção 10 min; coeficiente correlação linear 0,9920; limites de detecção e de quantificação 18,17 mg L⁻¹ x 10⁻⁴ e 55,067 mg L⁻¹ x 10⁻⁴, respectivamente. Para a BENZOPHENONE-3, o coeficiente correlação linear obtido foi 0,9955; limites de detecção e de quantificação, respectivamente, 45,67 mg L⁻¹ x 10⁻⁴ e 138,38 mg L⁻¹ x 10⁻⁴.

A avaliação de fotoprotetores exige a utilização de técnicas capazes de quantificações simultâneas uma vez que, normalmente, são associados diferentes filtros UV em uma mesma formulação para a promoção de proteção de amplo espectro. Os métodos empregados, até a atualidade, para a quantificação de filtros solares veiculados em formulações de uso tópico, como a CLAE e a espectrofotometria no UV, apresentam resultados adequados para esta finalidade e são aplicáveis para a avaliação de fotoprotetores. A espectroscopia de RMN apresenta características bastante apreciáveis para esta finalidade, já que por definição é uma técnica quantitativa e possibilita a quantificação simultânea e rápida de múltiplas substâncias.

Na literatura científica não foram encontrados relatos de quantificação simultânea dos filtros solares orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE utilizando a qRMN, mas estas substâncias foram analisadas por ¹H RMN quanto a fotoestabilidade (MONHAPHOL, ALBINSSON & WANICHWECHARUNGRUANG, 2006; DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006; PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001).

Pattanaargson & Limphong, 2001, avaliaram a fotoestabilidade do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e os produtos de fotodegradação. Estes foram isolados por CLAE e o espectro do ETHYLHEXYL

METHOXYCINNAMATE e de seus fotoprodutos indicaram uma mudança de *trans* ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE para o *cis* ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE.

Dondi, Albini & Serpone (2006), utilizaram a RMN para avaliar as interações da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE com ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, quando expostos à irradiação artificial. Os fotoprodutos gerados foram identificados por espectroscopia UV/visível, CLAE e por RMN ^1H e ^{13}C . A avaliação das estruturas resultantes foi auxiliada pelo exame de um sistema modelo formado pelo etilcinamato e dibenzoilmetano. A irradiação dos cinamatos e dicetonas resultou em um processo de cicloadição.

A RMN oferece a possibilidade de quantificação, bem como, a detecção de formação de subprodutos dos filtros EHMC e BMBM, uma vez que o sinal da ressonância é diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes. Este fato permite, em princípio, uma determinação precisa do número de estruturas moleculares e, conseqüentemente, de substâncias presentes em meio sólido ou líquido (GADAPE & PARIKH, 2011; MALZ, 2008; MALZ & JANCKE, 2005).

Diante do exposto nesta pesquisa buscamos desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação simultânea da BMBM, do EHMC e do BEMT em formulações fotoprotetoras, por espectroscopia de qRMN, para posterior avaliação da fotoestabilidade desses filtros em formulações fotoprotetoras.

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação simultânea da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE em formulações fotoprotetoras, utilizando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (qRMN), quanto aos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Agitador mecânico com hélice centrífuga – Fisatom[®], modelo 713D
- Agitador tipo vortex – Ika, modelo MS3 basic
- Balança analítica - Sartorius[®], modelo BL -210S
- Balança semi-analítica Metler[®], modelo p-120
- Espectrometro - Bruker[®]; modelo DPX300, com sonda multinuclear de 5 mm
- Geladeira – Bosch[®], modelo ecoplus 370
- Micropipeta - Labsystems[®]; modelo monocanal, volume variável de 10 a 100 µL
- Micropipeta - Labsystems[®], modelo monocanal, volume variável de 100 a 1000 µL
- Placa aquecedora – Ika[®], modelo HP10
- Peagômetro - Hanna[®], modelo 8417
- Sistema de osmose reversa - Gehaka[®], modelo OS10LX
- Termômetro digital - Incoterm[®], modelo tipo espeto, faixa de medição de 50 °C a 150 °C
- Tubos de vidro para análise RMN - Corning[®]

4.1.2 SOLVENTE

- Clorofórmio deuterado CDCl₃ (D, 99,8%) + folha de prata – Cil, São Paulo

4.1.3 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

- Dimetilsulfona, grau analítico, teor 98% - Sigma Aldrich

4.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS – GRAU DE PUREZA FARMACÊUTICA

As matérias-primas empregadas no desenvolvimento das formulações apresentavam grau de pureza farmacêutico.

- BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM) (98,8%), DSM, São Paulo
- ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) (98,0%), Basf, São Paulo (doação)
- BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT) (98,0%), Basf, São Paulo (doação)
- Rutina (98,8%); Pharmanostra, São Paulo
- Ácido cítrico, Mapric, São Paulo
- Água deionizada, (Laboratório Farmacotécnica)
- Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado(10 OE), (Crodafos[®] CES), Croda, São Paulo
- Co-polímero do ácido sulfônico acriloidimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado, (Aristoflex[®] AVC), Pharmaspecial, São Paulo
- Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno (Phenova[®]), Mapric, São Paulo
- Propilenoglicol, Mapric, São Paulo
- Triglicérides de ácido cáprico (e) caprílico (Crodamol[®] GTCC), Mapric, São Paulo
- Trietanolamina, Mapric, São Paulo

4.2 MÉTODOS

4.2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

O processo de validação da metodologia empregada, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) avaliou os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade (curva analítica), precisão, exatidão, limites de quantificação e de detecção, de acordo com os guias para validação analítica do ICH, AOAC INTERNACIONAL e ANVISA (ICH, 2005; AOAC, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.2.2 CONDIÇÕES ANALÍTICAS

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

4.2.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS POR qRMN

A intensidade do sinal do padrão interno de referência, dimetilsulfona, foi comparada a área do sinal do analito **Equação 6** (BATISTA *et al.*, 2008, WELLS *et al.*, 2002).

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

Equação 6. Cálculo para obtenção da concentração da substância pelo método absoluto qRMN

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

4.2.4 SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada analisando-se os filtros UV isoladamente, uma solução contendo os três filtros e a formulação isenta dos filtros químicos, que apresentava como componentes: água deionizada; triglicérides de ácido cáprico e caprílico; propilenoglicol; fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno; co-polímero do ácido sulfônico acriloldimetilaurato e vinilpirrolidona neutralizado e álcool cetearílico (e) fosfato de dicetil (e) fosfato de polietilenoglicol éter de álcool cetílico.

Todas as amostras foram analisadas de acordo com as condições analíticas descritas em 4.2.2., solubilizadas em $CDCl_3$ e analisadas em triplicata. Para cada filtro UV avaliado foram identificados e selecionados os sinais gerados para a quantificação daqueles com diferentes deslocamentos químicos, visando evitar sobreposição dos sinais (HOLZGRABE *et al.*, 2005; ICH, 2005; AOAC, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

4.2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

a) *FILTROS UV ISOLADOS*

Foram pesados exatamente cerca de 30 mg de BMBM, 30 mg de BEMT e 60 mg de EHMC, transferiu-se separadamente de forma quantitativa para balões volumétricos de 1,0 mL. Completou-se o volume com CDCl_3 , homogeneizou-se e 0,5 mL desta solução foram transferidos para tubos analíticos de RMN e a análise foi efetuada.

b) *MISTURA DOS FILTROS UV BMBM, EHMC E BEMT*

Foram pesados exatamente cerca de 30 mg de BMBM, 30 mg de BEMT e 60 mg de EHMC e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 mL. Procedeu-se de forma similar ao descrito no item 4.2.4.1, a.

c) *FORMULAÇÃO ISENTA DOS FILTROS UV*

Foram pesados exatamente cerca de 0,8 g de formulação isenta dos filtros UV e adicionou-se 1,0 mL de CDCl_3 . A mistura foi submetida por 5 min em agitador com vórtex, e centrifugada por 15 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o restante foi transferido para balão volumétrico de 1,0 mL. Adicionaram-se 20,0 mg de dimetilsulfona, utilizada como padrão interno (PI), o volume foi completado com CDCl_3 e transferido para tubos analíticos de RMN e análise foi efetuada.

4.2.5 LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada no intervalo de concentração de 10,0 e 40,0 mg mL^{-1} para BMBM e BEMT e 40,0 e 100,0 mg mL^{-1} para EHMC. As soluções foram preparadas como descrito em 4.2.4.1. Foram avaliadas seis concentrações, em triplicada, para cada filtro, simultaneamente. O padrão interno foi adicionado na concentração de 20,0 mg mL^{-1} para cada amostra e o solvente utilizado foi CDCl_3 .

4.2.6 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão e exatidão foram avaliadas por meio da repetibilidade intradia e interdias. Expressas como desvio padrão relativo (DPR), **Equação 7**, para a precisão e pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente, **Equação 8**, para a exatidão. Três concentrações foram avaliadas em triplicata para cada substância, simultaneamente: 20,0; 30,0 e 40,0 mg mL⁻¹ para BMBM e BEMT; e 40,0; 60,0 e 80,0 mg mL⁻¹ para EHMC. As amostras foram analisadas no mesmo dia para repetibilidade intradia e em três dias diferentes para a repetibilidade interdias.

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

Equação 7. Cálculo do Desvio Padrão Relativo do método analítico

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

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

Equação 8. Cálculo da Exatidão do método analítico

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

4.2.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação simultânea foi avaliado por meio da análise de diferentes concentrações dos filtros até o valor onde as amostras apresentaram valores de precisão e exatidão adequados. As soluções foram preparadas como descrito em 4.2.4.1.

4.2.8 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção do método foi estimado baseado nos resultados dos cálculos de regressão linear de três curvas de calibração que foram construídas com as concentrações próximas ao limite de quantificação, sendo expresso pela **Equação 9** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003):

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

Equação 9. Cálculo do Limite de Detecção do método analítico

Onde: **DP** - Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração; **IC** - Inclinação da curva de calibração.

4.2.9 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DO BMBM, EHMC e BEMT EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

A quantificação simultânea dos filtros BMB, EHMC e BEMT em formulações fotoprotetoras seguiu o mesmo protocolo definido para a seletividade, 4.2.4.1 c. Foram avaliadas a precisão e exatidão, expressas, respectivamente, como desvio padrão relativo (DPR %), (**Equação 7**), e pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, (**Equação 8**). Uma série de seis foi avaliada para cada substância, simultaneamente (20 mg mL⁻¹ para o BMBM e para o BEMT e 80 mg mL⁻¹ para o EHMC), no mesmo dia para a verificação da repetibilidade intra-dia e em três diferentes dias para a repetibilidade inter-dias.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filtros orgânicos foram quantificados de acordo com a relação área dos picos gerados pela análise das amostras, **Equação 6**.

5.1 SELETIVIDADE

Por meio da análise dos espectros foram avaliadas as possibilidades de sobreposição de sinais gerados pelos núcleos ressonantes de cada filtro UV e as possíveis interferências das matérias-primas utilizadas no desenvolvimento da formulação fotoprotetora.

Os espectros ^1H RMN das substâncias analisadas individualmente, da mistura dos três filtros UV e da formulação isenta dos filtros estão apresentados nas **Figuras 4 e 9**. Os dados obtidos por meio da avaliação dos espectros são relacionados nas **Tabelas 1, 2 e 3**.

Figura 4. Espectros de ^1H RMN dos filtros analisadas individualmente, BMBM **(a)** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, EHMC **(b)** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BEMT **(c)** = BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE e na mistura dos três, com destaque para os sinais dos núcleos de H selecionados para cada filtro.

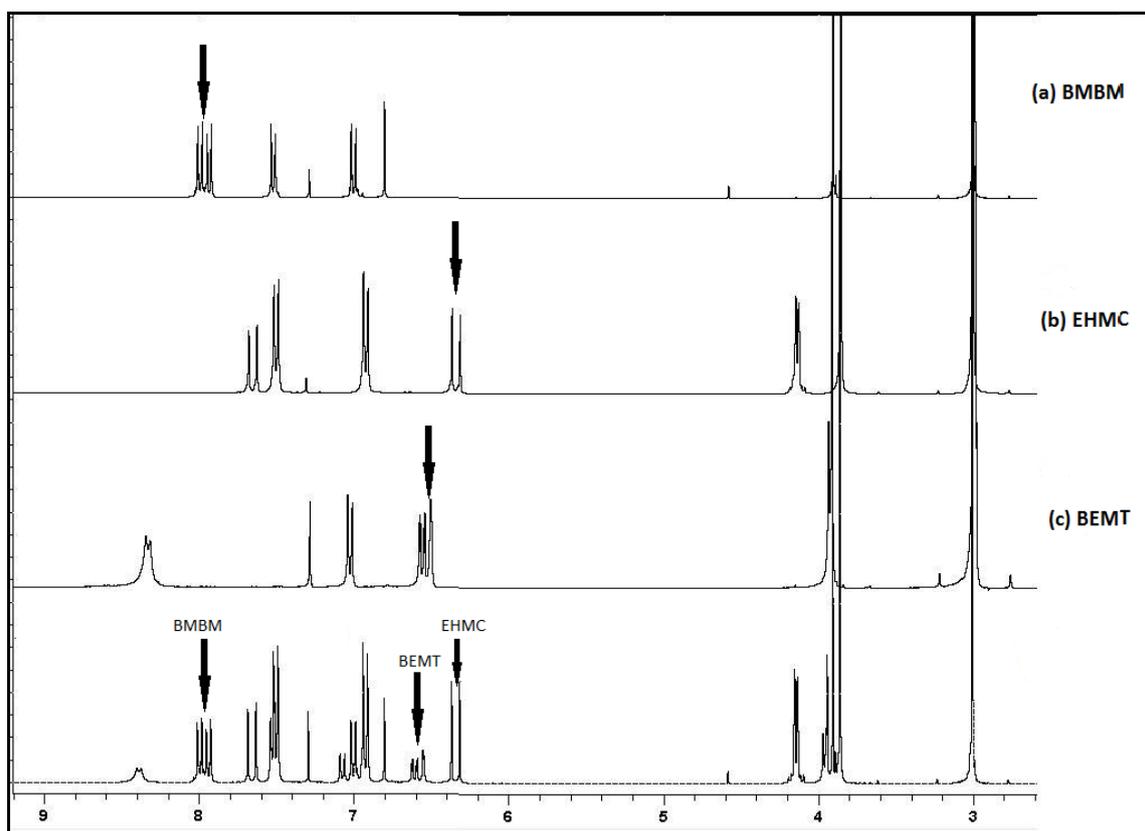


Tabela 1. Dados experimentais da análise ^1H RMN da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM), solubilizada em CDCl_3 , e da literatura solubilizada em C_6D_6 (Mturi & Martincigh, 2008). Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação deste filtro.

Posição do hidrogênio		Deslocamento químico (ppm)	
		Literatura C_6D_6	Obtido CDCl_3
4CH	2, 6, 11 e 15	7,9-7,8	7,98
2CH	3 e 5	6,8	6,98
CH	8 enol	6,65	6,81
CH_2	8 ceto	5,10 (sinal reduzido)	4,58 (sinal reduzido)
2CH	12 e 14	7,4	7,51
3 CH_3	17, 18 e 19	1,33	1,39
CH_3	20	3,72	3,89

Figura 5. Forma estrutural da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM), em destaque (na cor vermelha) estão as posições dos hidrogênios selecionados para quantificação por meio da qRMN.

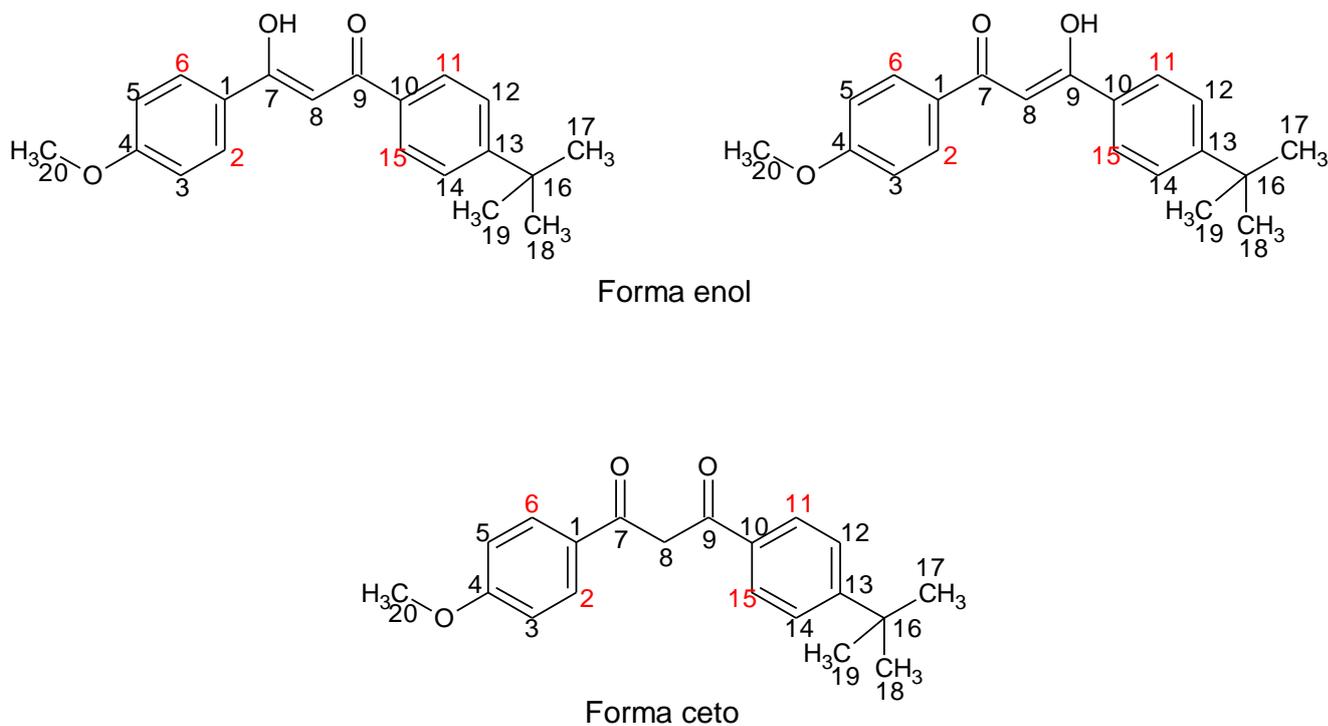


Tabela 2. Dados experimentais da análise de ^1H RMN do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) e dados da literatura (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001), ambos solubilizados em CDCl_3 . Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação desse filtro.

Posição do hidrogênio		Deslocamento químico (ppm)	
		Literatura	Obtido
CH_3	1	3,81	3,84
2CH	3	6,87	6,91
2CH	4	7,40	7,49
CH	6	7,61	7,65
CH	7	6,29	6,33
CH_2	9	4,09	4,13
CH	10	1,63	1,66
CH_3	12 e 16	0,93	0,97
CH_2	11, 13, 14 e 15	1,38	1,43

Figura 6. Forma estrutural do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC), em destaque (na cor verde) está marcada a posição do hidrogênio selecionado para quantificação por meio da qRMN.

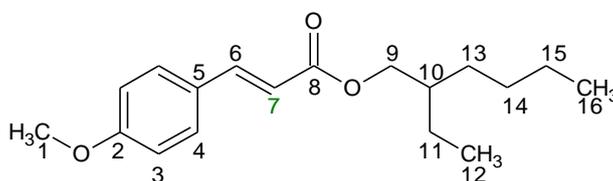
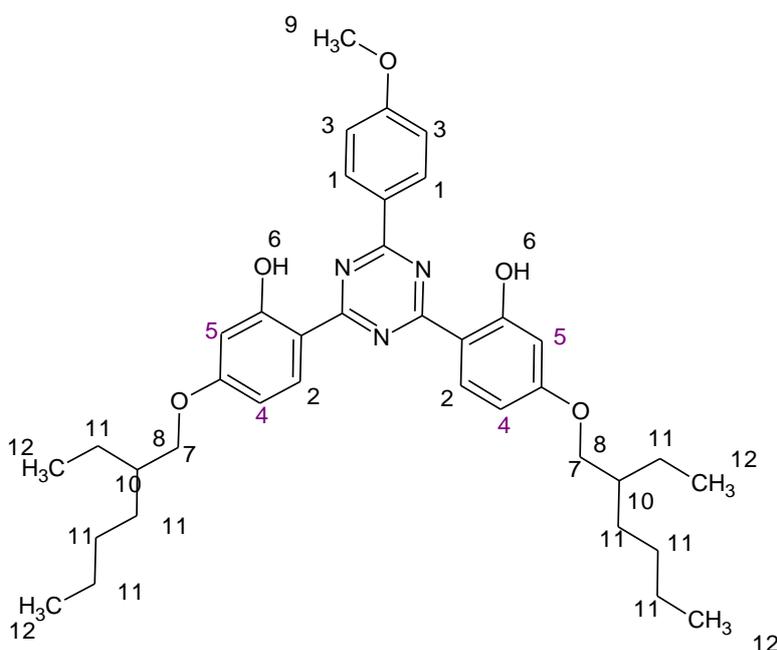


Tabela 3. Dados experimentais da análise de ^1H RMN do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT) solubilizado em CDCl_3 . Com destaque para o sinal do H selecionado para a quantificação desse filtro.

Posição do hidrogênio		Deslocamento químico (ppm) obtido
CH	1	8,24-8,27
CH	2	
CH	3	6,95-6,97
CH	4	6,44-6,52
CH	5	
CH ₂	7	3,80-3,95
CH ₂	8	
CH ₃	9	1,7-1,8
CH	10	
CH ₂	11	1,34-1,60
CH ₃	12	0,92-0,97

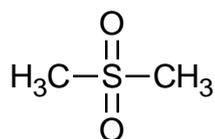
Figura 7. Forma estrutural do BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT), em destaque (na cor roxa) está marcada a posição do hidrogênio selecionado para quantificação por meio da qRMN.



A seleção dos sinais para a determinação por qRMN foi baseada na ausência de sobreposições de sinais entre os filtros avaliados. Na **Figura 4** estão indicados, por meio de setas, os sinais selecionados e nas **Tabelas 1, 2 e 3** estão descritos os deslocamentos químicos das moléculas avaliadas e destacados os deslocamentos de cada sinal selecionado.

Para a avaliação quantitativa da BMBM foi selecionado o sinal gerado pelos hidrogênios que estão nas posições 2,6 e 11,15 (**Figura 5**) com deslocamento químico obtido na região **7,98 ppm**. Para o EHMC foi selecionado o sinal gerado pelo hidrogênio na posição 7 (**Figura 6**) com deslocamento químico obtido em **6,33 ppm**. Para a avaliação da BEMT foi selecionado o sinal gerado pelos hidrogênios na posição 4 e 5, com deslocamento químico entre **6,44-6,52 ppm**, (**Figura 7**). O sinal gerado pelos hidrogênios do padrão interno dimetilsulfona é verificado em **3,0 ppm**. Os átomos de hidrogênio, da dimetilsulfona apresentaram-se dispostos na molécula de maneira que produziram um único sinal no espectro, facilitando sua visualização **Figura 8 e 9**.

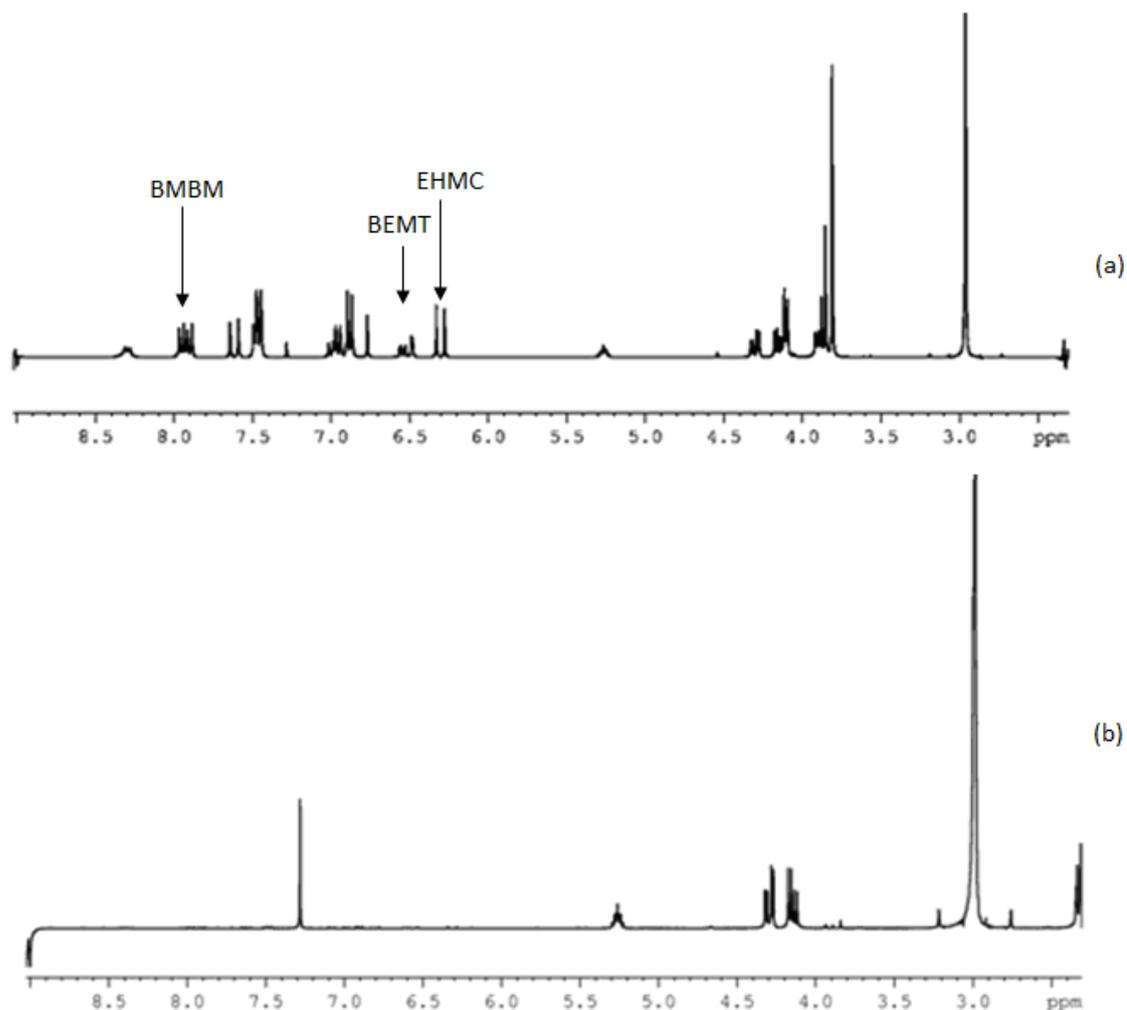
Figura 8. Forma estrutural da molécula de dimetilsulfona, utilizada como padrão interno para a quantificação dos filtros UV.



A **Figura 9 (a)** apresenta o espectro ^1H RMN de uma formulação que contém a **BMBM**, **EHMC** e o **BEMT** e **(b)** de uma formulação sem a adição desses filtros.

A ausência de sinais nas regiões selecionadas para a quantificação dos filtros orgânicos demonstrou a especificidade do método para os filtros avaliados **BMBM**, **EHMC** e **BEMT**.

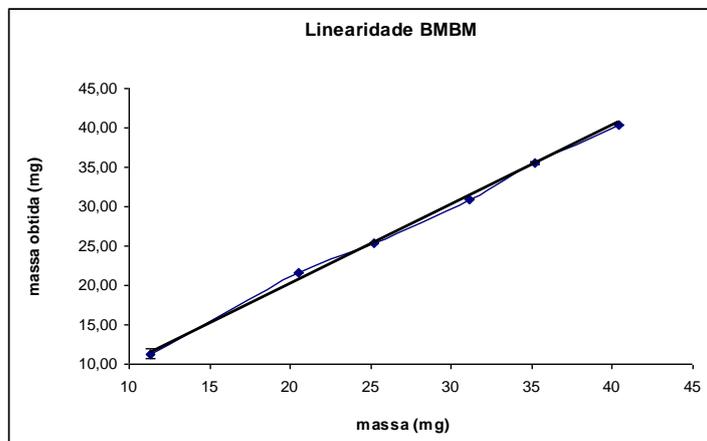
Figura 9. Espectro de ^1H RMN da formulação com os filtros químicos **BMBM**, **BEMT** e **EHMC** (a) e da formulação isenta dos filtros químicos (b), com destaque para os sinais dos núcleos de H selecionados para cada filtro.



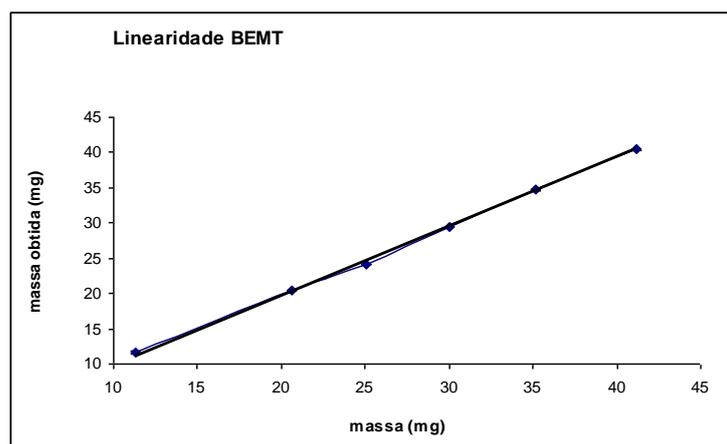
5.2 LINEARIDADE, LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO, PRECISÃO E EXATIDÃO

Por meio da curva analítica avaliou-se a linearidade do método: no intervalo 10,0 a 40,0 mg mL^{-1} para os filtros BMBM e BEMT e 40,0 a 100,0 mg mL^{-1} para o EHMC, apresentando coeficiente de correlação linear superior a 0,99 (**Tabela 4**) para todos os filtros avaliados simultaneamente, estando de acordo com a literatura científica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Os resultados estatísticos da validação do método analítico são apresentados nas **Tabelas 4 e 5** e **Figura 10**.

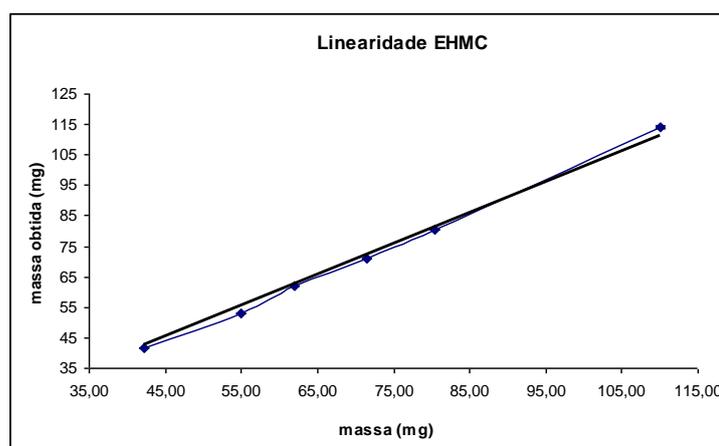
Figura 10. Linearidade do método de quantificação simultânea ^1H RMN para os filtros **BMBM** (BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE) **(a)**, **BEMT** (BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE) **(b)** e **EHMC** (ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE) **(c)** e avaliada pela relação entre a massa real e a massa obtida em mg.



(a)



(b)



(c)

Tabela 4. Resultados obtidos por meio da análise da regressão linear e determinação quantitativa pelo método ^1H qRMN e LQ e LD para os filtros **BMBM**, **BEMT** e **EHMC**, simultaneamente.

Parâmetro estatístico	BMBM	BEMT	EHMC
Filtro (mg mL^{-1})	10,0-40,0	10,0-40,0	40,0-100,0
Equação de regressão linear	$y = 1,0068x$	$y = 0,9817x$	$y = 1,0092x$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,998	0,999	0,994
LQ* (mg mL^{-1})	10,0	10,0	40,0
LD** (mg mL^{-1})	0,25	0,08	1,64

Legenda: *Experimental; **Estimado; **LQ** - Limite de Quantificação; **LD** - Limite de Detecção; **BMBM** - BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** - BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE; **EHMC**-ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE ; **x**=coeficiente angular; **y**=coeficiente correlação linear.

Os Limites de Detecção (**LD**) foram estimados de acordo com a **Equação 9**. Os Limites de Quantificação (**LQ**) foram determinados experimentalmente, a partir da avaliação de diferentes concentrações dos três filtros solubilizados em $CDCl_3$ até o limite em que as amostras apresentaram valores de precisão e exatidão adequados, respectivamente abaixo de 5,0% e entre 97,3 e 104,8%, para os três filtros e estando coerentes com as indicações da literatura científica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Os resultados são apresentados na **Tabela 5**. A precisão e exatidão também foram verificadas para a quantificação dos filtros extraídos da formulação. Os resultados são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 5. Resultados da precisão e exatidão, avaliadas pela repetibilidade intra-dia e inter-dias, sendo a precisão expressa como desvio padrão relativo (DPR %), e a exatidão pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente, dos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** em solução.

Concentração avaliada mg mL ⁻¹	BMBM				BEMT				EHMC			
	DPR (%)		Exatidão (%)		DPR (%)		Exatidão (%)		DPR (%)		Exatidão (%)	
	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**
20,0	0,075	0,023	104,7	104,8	0,011	0,076	97,3	97,7	-	-	-	-
30,0	0,020	0,010	100,3	99,8	0,009	0,087	98,7	99,0	-	-	-	-
40,0	0,039	0,047	101,7	100,0	0,012	0,070	98,0	98,2	0,004	0,083	97,8	98,0
60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,008	0,097	99,8	99,9
80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,013	0,145	100,2	100,4

Legenda: *concentrações avaliadas em triplicata, no mesmo dia, ** concentrações avaliadas em triplicata em três dias diferentes, concentrações não avaliadas. ; **BMBM** - BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** - BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE; **EHMC**-ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

Tabela 6. Resultados da precisão e exatidão calculados para a quantificação simultânea dos filtros **BMB**, **EHMC** e **BEMT** na formulação fotoprotetora e avaliados pela repetibilidade intra-dia e inter-dias, sendo a precisão expressa como desvio padrão relativo (DPR %), e a exatidão pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente.

Concentração avaliada mg mL ⁻¹	BMBM				BEMT				EHMC			
	DPR (%)		Exatidão (%)		DPR (%)		Exatidão (%)		DPR (%)		Exatidão (%)	
	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**	Intra*	Inter**
20,0	4,8	1,32	105,3	105,4	4,5	1,49	97,2	96,8	-	-	-	-
80,0	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	1,85	101,9	101,31

Legenda: *amostras avaliadas no mesmo dia (n = 6), ** amostras avaliadas em três dias diferentes (n = 6), - concentrações não avaliadas. **BMBM** - BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** - BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE; **EHMC** - ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

O método analítico desenvolvido apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros avaliados, de acordo com a literatura.

Por meio da avaliação da pesquisa de interferentes foi possível verificar a especificidade do método, analisando-se os espectros dos três filtros solares (BMBM, EHMC e BEMT) separadamente e, simultaneamente, na formulação não ocorrendo a sobreposição dos sinais dos filtros emitidos pelos núcleos ressonantes avaliados. Além disso, a análise da formulação adicionada ou isenta dos filtros permitiu confirmar que não houve interferências nas regiões selecionadas para quantificação dos núcleos ressonantes dos filtros UV e das matérias-primas utilizadas no preparo da formulação.

A linearidade foi avaliada simultaneamente e apresentou resultados satisfatórios, verificando-se a proporcionalidade entre a concentração dos filtros UV, e a resposta dentro dos intervalos especificados. O coeficiente correlação linear, (R^2) foi maior que 0,99 para os três filtros solares avaliados (**BMBM**, **EHMC** e **BEMT**) e está de acordo com os requisitos de aprovação da literatura (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Avaliando-se os resultados da correlação linear da validação do método qRMN para a quantificação simultânea da **BMBM**, **EHMC** e **BEMT**, que foram, respectivamente, 0,998; 0,994 e 0,999; verificando que a correlação obtida entre os sinais e a concentração foram diretamente proporcionais à concentração dos filtros UV, obtendo-se valores comparáveis com outras metodologias mencionadas na literatura como CLAE. Diferentes pesquisadores utilizaram a última técnica e obtiveram resultados similares ao quantificarem simultaneamente diferentes filtros solares, variando de 0,993 a 0,9997 (DENCAUSSE *et al.*, 2008; KEDDOR *et al.* 2006; SANTORO *et al.*, 2004; SALVADOR, DE LA OSSA & CHISVERT, .2003; CHISVERT, PASCUAL-MARTI & SALVADOR, 2001; DINUNZIO & GADDE, 1990). Dentre estes trabalhos, destacamos os resultados obtidos por Dencausse e colaboradores, (2008) que avaliaram simultaneamente a BENZOPHENONE-3, a BMBM, o EHMC e o BEMT, obtendo-se como resultados da correlação linear,

respectivamente, 0,993; 0,996; 0,995 e 0,996, e concordantes com os obtidos pelo método qRMN empregado nesta pesquisa.

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade intra e inter-dias e a proximidade dos resultados obtidos foi expressa pelo DPR. Segundo a literatura, o valor do DPR resultante não deve ser superior a 5,0% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2003). O método proposto apresentou DPR intra-dia de 4,8% para o BMBM; 4,5% para o **BEMT**; e 4,6% para o **EHMC**. O DPR inter-dias foi de 1,32% para a **BMBM**; 1,49% para o **BEMT** e 1,85% para o **EHMC**. Todos os valores obtidos ficaram abaixo do máximo preconizado, indicando a precisão adequada do método (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Quantificações simultâneas de filtros solares realizadas por CLAE, por diferentes pesquisadores, resultaram em valores de precisão entre 0,08 a 3,4% de DPR (DENCAUSSE *et al.*, 2008; KEDDOR *et al.* 2006; SANTORO *et al.*, 2004; SALVADOR, DE LA OSSA & CHISVERT 2003; CHISVERT, PASCUAL-MARTI & SALVADOR, 2001; DINUNZIO *et al.*, 1990). DENCAUSSE e colaboradores (2008) obtiveram DPR de 0,08 a 1,98% para a BENZOPHENONE-3, a **BMBM**, o **EHMC** e o **BEMT**.

A exatidão do método foi confirmada dentro do intervalo de linearidade estabelecido e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a teórica correspondente. Os resultados obtidos para a exatidão intra e inter-dias foram, respectivamente, de 105,3 e 105,4% para **BMBM**; 97,2 e 96,8% para o **BEMT**; e 101,9 a 101,9% para o **EHMC**. De acordo com a literatura científica, quando estes filtros solares foram avaliados, isolados ou em combinações por CLAE, obtiveram-se resultados de 96,0 a 104,8% de exatidão (DENCAUSSE *et al.*, 2008; KEDDOR *et al.* 2006; SANTORO *et al.*, 2004; SALVADOR, DE LA OSSA & CHISVERT, 2003; CHISVERT, PASCUAL-MARTI & SALVADOR, 2001; DINUNZIO & GADDE, 1990). No trabalho desenvolvido por Dencausse e colaboradores, 2008, o resultado da avaliação da exatidão foi de 101 a 103,3% para BENZOPHENONE-3; 99,2 a 100,6% para a BMBM; 104,0 a 104,8% para o EHMC; e 99,3 a 101,8% para o BEMT. Estes valores registrados na literatura

científica fora próximos aos obtidos pelo método desenvolvido utilizando a qRMN.

Não foram encontrados registros na literatura de um método analítico quantitativo qRMN para a determinação simultânea de **BMBM**, **EHMC** e **BEMT**, o que confere característica inovadora ao método desenvolvido. Os valores da validação do método analítico qRMN para determinação de BMBM, EHMC E BEMT apresentaram resultados satisfatórios quando comparado aos da literatura obtidos por CLAE e apresentou como vantagens: facilidade de preparação da amostras, utilização de volumes reduzidos de solvente e de tempo de análise, uma vez que o tempo total de análise simultânea foi de aproximadamente 10 minutos.

6 – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Baseado na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) o método analítico desenvolvido e validado, , apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e de quantificação adequados, para quantificação simultânea dos filtros BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (**BMBM**) (filtro UVA), ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (**EHMC**) (filtro UVB) e BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (**BEMT**) (filtro UVA e UVB), em formulações de uso tópico tipo emulsão. A linearidade foi verificada nos intervalos entre 10,0 e 40,0 mg mL⁻¹ para os filtros **BMBM** e **BEMT** e 40,0 e 100,0 mg mL⁻¹ para o **EHMC** e apresentou coeficiente de correlação linear igual a 0,998; 0,999 e 0,994, respectivamente. A precisão, expressa em desvio padrão relativo (DPR), foi avaliada intra-dia, com resultado de 4,8% para a **BMBM**; 4,5% para o **BEMT**; e 4,6% para o **EHMC**, e inter-dias, com resultado de 1,32 para a **BMBM**; 1,49 para o **BEMT** e 1,85 para o **EHMC**. A exatidão foi confirmada dentro do intervalo de linearidade estabelecido e os resultados obtidos intra e inter-dias foram, respectivamente, de 105,3 e 105,4% para **BMBM**; 97,2 e 96,8% para o **BEMT**; e 101,9 a 101,9% para o **EHMC**. Os limites de detecção estimados foram 0,25 mg.mL⁻¹ para a **BMBM**; 0,08 mg.mL⁻¹ para o **BEMT** e 1,64 mg.mL⁻¹ para o **EHMC**. O limite de quantificação para a **BMBM** e o **BEMT** foi de 10,0 mg.mL⁻¹ e para o **EHMC** foi de 40,0 mg.mL⁻¹.

O método desenvolvido nesta pesquisa foi validado é inovador e tem potencial de aplicação prática para quantificação filtros solares em formulações de uso tópico e apresentou como principais vantagens: o tempo de análise reduzido, apenas 10 minutos para a determinação simultânea dos três filtros, preparação simplificada das amostras e a utilização de volumes reduzidos do solvente CDCl₃. A redução do volume de solvente está em consonância com o conceito de preservação ambiental de acordo com as orientações da Química Verde. Além disso, a RMN pode fornecer simultaneamente a quantificação dos filtros solares , informações relevantes sobre as possíveis alterações moleculares que as substâncias quantificadas podem apresentar durante o estudo da estabilidade da formulação ao longo do tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABIHPEC. **Anuário 2012**. 3.ed. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, 2012. 149p. (Public Projetos Editoriais). Disponível em: http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2012/12/ABIHPEC_2012_internet.pdf. Acesso em: 20 nov. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cosméticos. **Proteção solar**: sua pele merece esse cuidado. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/prot_solar/index.htm. Acesso em: 06 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 20 set. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2006**. Aprova Regulamento Técnico, Lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/de350b804aee4112b762bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+48,+de+16+de+mar%C3%A7o+de+2006.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2008. 120p. (Séries Temáticas: Qualidade, 1).

AMERICAN CANCER SOCIETY. Learn About Cancer. What Causes Cancer. Sun and UV Exposure. Skin Cancer Prevention and Early Detection. **What is ultraviolet (UV) radiation?** 2013. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/sunanduvexposure/skincancerpreventionandearlydetection/skin-cancer-prevention-and-early-detection-what-is-uv-radiation>. Acesso em: 20 jun. 2013.

AOAC. Association of Analytical Communities. **Single-Laboratory Validation of Analytical Methods**. 2003. Disponível em: http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf. Acesso em: 10 dez. 2011.

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

AUSTRALIA. Australian Government. Department of Health and Ageing For further information. **National Skin Cancer Awareness Campaign**. 2010. Disponível em: <http://www.skincancer.gov.au/internet/skincancer/publishing.nsf/Content/home>. Acesso em: 22 fev. 2011.

BATISTA, I.A.S.A.; GONÇALVES, M.I.A.; SINGH, A.K.; HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of dimethylaminoethanol in cosmetic formulations by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v.91, n.6, p.1303-1308, 2008.

BERNEBURG, M.; GREYER-BECK, S.; KURTE, V.; RUZICKA, T.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; KRUTMANN, J. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.22, p.15345-15349, 1999.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzene) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.3, p.401-406, 2001.

CHAWLA, H.M.; MRIG, S. Simultaneous quantitative estimation of Oxybenzone and 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by second order derivative spectrophotometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v.64, n.6, p.585-592, 2009.

CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTI, M.C.; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorized in sunscreens by high-performance liquid chromatography: use of cyclodextrins as mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v.921, n.2, p.207-215, 2001.

DENCAUSSE, L.; GALLAND, A.; CLAMOU, J.L.; BASSO, J. Validation of HPLC method for quantitative determination of Tinosorb[®]S and three other sunscreens in a high protection cosmetic product. **International Journal of Cosmetic Science**, v.30, n.5, p.373-382, 2008.

DINUNZIO, J.E.; GADDE, R.R. Determination of sunscreen compounds in topical sunscreen products. **Journal of Chromatography A**, v.519, n.1, p.117-124, 1990.

DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.5, n.9, p.835-843, 2006.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M.A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

GADAPE, H.H.; PARIKH, K.S. Quantitative determination and validation of pioglitazone in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.1, p.649-664, 2011.

GIOKAS, D.L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: from sunscreen to human body and the environment. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.5, p.360-374, 2007.

HOLLIS, D.P. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.35, n.11, p.1682-1684, 1963.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. Quantitative NMR spectroscopy — applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, n.5, p.806-812, 2005. [Review].

ICH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)**. 2005, 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 10 abr. 2010.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientações sobre a validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 2010. 20p. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em: 10 mar. 2011.

JUNGNICKEL, J.L.; FORBES, J.W. Quantitative measurement of hydrogen types by intergrated nuclear magnetic resonance intensities. **Analytical Chemistry**, v.35, n.8, p.938-942, 1963.

KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; GONZALEZ, M.L.L.P.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of five sunscreens in lotion preparation **International Journal of Cosmetic Science**, v.28, n.3, p.219-224, 2006.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.C.; PITTELKOW, M.R. Photoprotection. **Lancet**, v.370, n.9586, p.528-537, 2007.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solarsimulated radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, n.2, p.256-262, 2001.

MALZ, F. Quantitative NMR in the solution state NMR. In: HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. **NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis**. Oxford: Elsevier, 2008. p.43-47.

MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, n.5, p.813-823, 2005.

MTURI, G.J.; MARTINCIGH, B.S. Photostability of the sunscreens agent 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v.200, n.2/3, p.410-420, 2008.

MONHAPHOL, T.; ALBINSSON, B.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.P. 2-ethylhexyl-2,4,5-trimethoxycinnamate and di-(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate as novel UVA filters. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.2, p.279-288, 2006.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.Á. A blocked diketo form of avobenzone: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.

PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v.23, n.3, p.153-160, 2001.

PAULI, G.F.; GÖDECKE, T.; JAKI, B.U.; LANKIN, D.C. Quantitative ¹H NMR: development and potential of an analytical method- an update. **Journal of Natural Products**, n.75, v.4, p.834-851, 2012.

SALEM, A.A.; MOSSA, H.A.; BARSOUM, B.N. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.2, p.654-661, 2006.

SALVADOR, A.; DE LA OSSA, M.D.; CHISVERT, A. Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenone-3, octyl dimethyl PABA and octyl methoxycinnamate in lipsticks. **International Journal of Cosmetic Science**, v.25, n.3, p.97-102, 2003.

SANTORO, M.I.R.M.; OLIVEIRA, D.A.G.C.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SINGH, A.K. Quantifying benzophenone-3 and octyl methoxycinnamate in sunscreen emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v.119, n.9, p.77-82, 2004.

SCHWEITZER, G.K.; BENSON, E.W. Enol content of some beta-diketones. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.13, n.3, p.452-453., 1968.

SHAATH, N.A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A.; PATHAK, M.A., eds. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.3-33. (Cosmetic science and technology series, v. 15).

SHAMSIPUR, M.; TALEBPOUR, Z.; BIJANZADEH, H.R.; TABATABAEI, S. Monitoring of ampicillin and its related substances by NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, n.4, p.1075-1085, 2002.

SILVA, C.A.; PEREIRA, D.C. MARQUES, E.D.; RAHAL, I.C.K.A.; FALCONI, K.; FAVARETTO, L. PLENTZ, L.P. RECHE, P.M.; RAMALHO, A.F.S.; FERRARI, M. A ciência cosmética como instrumento da Saúde Pública: uso correto de fotoprotetores. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.159-165, 2009.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. International Conference on Harmonisation: guidelines for the photostability testing of new drug substances and products; availability. **Federal Register**, v.62, n.95, p.27115-27122, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM129106.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2009. Acesso em: 05 fev. 2011.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Sun safety: save your skin!** Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM143731.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2011.

WELLS, R.J.; HOOK, J.M.; AL-DEEN, T.S.; HIBBERT, D.B. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) spectroscopy for assessing the purity of technical grade agrochemicals: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and sodium 2,2-dichloropropionate (Dalapon sodium). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.12, p.3366-3374, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sun protection: an essential element of health-promoting Schools**. Orvieto: WHO, 2002. (Information series on school health, Document seven). Disponível em: http://www.who.int/school_youth_health/media/en/456.pdf. Acesso em: 08 set. 2011. 11 set. 2012.

ZOPPI, A.; LINARES, M.; LONGHI, M. Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, n.3, p.627-630, 2005.

Capítulo 2

Avaliação da influência da adição da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos da radiação solar para o corpo humano são inegáveis. O aquecimento do corpo, a estimulação da circulação sanguínea e o tratamento de doenças como o raquitismo, a icterícia, a psoríase, o eczema, a esclerose múltipla e a asma são benefícios diretos da exposição a radiação solar, além disso, também proporciona sensação de bem estar e a produção de vitamina D, essencial para a manutenção da saúde e prevenção de doenças. Apesar dos benefícios, o excesso de exposição pode trazer danos agudos e crônicos importantes à saúde (HART, GORMAN & FLINAY-JONES, 2011; MCKENZIE, LILEY, BJÖRN, 2009; FORESTIER, 2008; GRANT & HOLICK, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A percepção da relação entre a exposição solar e os danos causados a pele levou a busca por diferentes formas de proteção frente à radiação solar. Registros apontam que no Egito Antigo as mulheres protegiam a pele com diferentes preparações, pois preferiam a pele clara, que era considerada mais bonita na hierarquia da beleza (SHAATH, 2006).

Atualmente, os riscos associados à exposição excessiva a radiação solar são reconhecidos e continuam sendo objeto de estudo de diferentes pesquisadores. A radiação Ultra Violeta (UV) é considerada responsável por provocar danos agudos, como as queimaduras solares e efeitos crônicos, como o câncer de pele (FORESTIER, 2008).

A radiação UV que compreende a região entre 290 a 320 nm (UVB) é a principal causa direta de danos fotoquímicos ao DNA levando a mutações genéticas. No entanto, a radiação UVA, que possui comprimento de onda entre 320 a 400 nm causa danos indiretos ao DNA, por via da geração de espécies de oxigênio reativo (MOYAL, 2012; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

A minimização dos efeitos deletérios da radiação UV envolve, em primeiro lugar, a educação pública contínua sobre a fotoproteção, sendo que as principais recomendações são: evitar a exposição excessiva ao sol; proteger o

corpo por meio da utilização de roupas, chapéu e óculos; além disso, utilizar fotoprotetor tópico, especialmente para prevenir ou reduzir ao mínimo os danos celulares (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011; UNITED STATES, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; AUSTRALIAN, 2010; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

Por motivos comportamentais, atualmente, os povos ocidentais não adotam a utilização de vestimentas como primeira linha de proteção contra os efeitos danosos da radiação UVA e UVB, tornando a utilização do fotoprotetor de uso tópico um importante aliado para a proteção da pele. Normalmente, uma formulação fotoprotetora contém uma combinação de filtros veiculados em uma matriz complexa para obtenção de produtos que ofereçam efetividade, segurança e facilidade de aplicação (SAMBANDAN & RATNER, 2011; FORESTIER, 2008).

O desenvolvimento de produtos contendo filtros orgânicos é um desafio ao formulador em função da instabilidade inerente a certos filtros. A maioria das substâncias empregadas como filtros UV apresenta fotorreatividade e podem conduzir a formação de fotoprodutos, conseqüentemente perdendo a função fotoprotetora. A preocupação com este tema pode ser notada pelo aumento de publicações a partir da década de 90 (MOYAL, 2012; GONZALEZ, 2011; MAIER *et al.* 2001; TARRAS-WAHLBERG *et al.*, 1999).

Para o desenvolvimento de uma formulação fotoprotetora eficiente, que ofereça proteção frente a radiação UVA e UVB, frequentemente são realizadas combinações de filtros que atuam nestas regiões espectrais da radiação solar.

A associação do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE é conhecida e muito utilizada em formulações manipuladas e industrializadas por proporcionar amplo espectro de proteção, porém apresenta alteração na absorção espectral após irradiação UV (PARIS, *et al.*, 2009; TARRAS-WAHLBERG *et al.* 1999).

Atualmente, são utilizados fotoestabilizadores como cinamatos, derivados de cânfora ou triazinas no desenvolvimento de protetores solares

contendo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. Porém, as substâncias empregadas até o momento, não foram capazes de diminuir a formação de radicais livres. Acredita-se que a fotoinstabilidade do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE é biologicamente relevante e tem sido evidenciada por danos na formação do DNA, modificação oxidativa da albumina, diminuição da sobrevivência de células de leveduras, citotoxicidade de queratinócitos humanos e peroxidação lipídica (PARIS *et al.*, 2009; MASNEC & PODUJE, 2008; CHAUDHURI *et al.*, 2006).

Devido a semelhança estrutural dos flavonoides com os filtros solares químicos, adicionalmente às propriedades antioxidantes, esta classe apresenta potencial na prevenção do estresse fotooxidativo na pele e devido a similaridade dos espectros de absorção na região da radiação UV tais compostos bioativos apresentam potencial para exercerem atividade fotoprotetora (ALMEIDA, *et al.*, 2010; CASAGRANDE *et al.*, 2007, VELASCO *et al.*, 2008). Dentre estes, a rutina (3-O-rutinosídeo-quercetina), flavonoide da classe dos flavonóis, apresenta potencial de aplicação como substância aditiva em formulações fotoprotetoras, com capacidade de elevação do fator de proteção solar e da fotoestabilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BABY *et al.*, 2008; VELASCO *et al.*, 2008).

Produtos naturais de origem vegetal são importantes e promissores fonte de substâncias bioativas, muitos dos quais constituem em modelos para a síntese de um elevado número de fármacos e substâncias cosméticas funcionais. A pesquisa química de produtos naturais está direcionada à extração e/ou isolamento e identificação de substâncias químicas de origem vegetal ou animal, com potencial de aproveitamento pelas indústrias Química, Farmacêutica, de Produtos Cosméticos e outras de importância econômica (PINTO *et al.*, 2002). O Brasil possui entre 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial, mas exploração de produtos naturais e as inovações tecnológicas em nosso país tem sido de baixa e média intensidade frente à rica diversidade local, sendo preciso ainda importar tecnologia e pagar *royalties* para os laboratórios estrangeiros. Buscar alternativas para aplicar os derivados dos produtos naturais pode colaborar para o desenvolvimento tecnológico da

exploração desses produtos (BARREIRO & BOLZANI, 2009; FUNARI & FERRO, 2005).

Dentre as espécies da flora nacional com grande potencial de exploração econômica destaca-se a fava-d'anta, *Dimorphandra mollis* Benth., esta árvore, nativa do Cerrado Brasileiro, é rica em rutina e quercetina e é responsável por 50% da produção mundial de rutina (NUNES *et al.* 2012).

A associação da rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) como fotoprotetor bioativo e os filtros químicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (UVA) e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (UVB) com foco na fotoestabilização de formulações fotoprotetoras apresenta potencial de aplicação de derivados naturais brasileiros. Substâncias de origem natural, especialmente os flavonoides, conduziram a resultados relevantes visando a eficácia fotoprotetora e na fotoestabilização de filtros UV (SCALIA & MEZZENA, 2010; VELASCO *et al.*, 2008, COQUENET *et al.*; 2008, FILIPE *et al.*, 2005).

Frente ao exposto, este trabalho propõe o desenvolvimento e avaliação de formulações fotoprotetoras contendo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e *ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE* associados à rutina visando a fotoestabilização dos filtros UV utilizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FOTOPROTEÇÃO

Evidências arqueológicas e antropológicas indicam que nossos antepassados de diferentes civilizações adoraram o sol e o reverenciaram como um deus. Entre 3000 e 500 A.C. hieróglifos e os alfabetos egípcio, assírio, persa e babilônio refletiram a importância que estas civilizações deram ao sol em suas culturas. Na **Figura 1** está retratado o Rei Akhenaton com sua esposa, a rainha Nefertiti e três de suas filhas sob os raios do deus sol Aton, século 14 antes de Cristo. Outras civilizações como os druidas, os astecas, os incas e os índios americanos, também, divinizaram o sol. Os gregos foram os primeiros a escrever sobre a importância da luz solar para a saúde humana, eles adoravam o deus sol Hélios (ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 2013; HOCKBERGER, 2002).

Figura 1. Akhenaton: Akhenaton, Nefertiti e três filhos de seus filhos sob os raios do deus sol Aton (Fonte: ENCICLOPEDIA BRITANICA, GALLERIES, 2013).



A percepção dos efeitos da radiação solar sobre a vida humana, incluindo seus benefícios e malefícios ocasionou a busca pela fotoproteção. Na

literatura, não existem muitos registros sobre a utilização de qualquer forma específica de fotoproteção entre os povos antigos, mas algumas vestimentas podem ser relacionadas a este cuidado, como sári e a toga, usados por mulheres egípcias. Além disso, diferentes acessórios foram usados para a proteção da cabeça nas mais diferentes culturas, como chapéus de palha, gorros, turbantes e perucas. Os povos antigos do Egito, Mesopotâmia, China e Índia, também, usaram as “sombrinhas” para se proteger do sol (HOCKBERGER, 2002; URBACH, 2001).

O ideal de beleza entre as mulheres dos antigos povos da Grécia e do Egito era a pele clara. Para alcançar este objetivo eram usados materiais em pó na cor branca, geralmente sais de arsênio, considerado um dos primeiros materiais cosméticos (URBACH, 2001).

A partir do século I (D.C.), Celsius, astrônomo sueco, recomendou a aplicação de óleo sobre a pele, com a finalidade de proteção da radiação. Os tibetanos usavam como fotoprotetor uma combinação de alcatrão e ervas e alguns grupos indígenas decoravam a pele com uma variedade de extratos de plantas por razões culturais, que também atuava como fotoprotetor (HOCKBERGER, 2002; URBACH, 2001)

Segundo Schalka & Reis (2011) os primeiros registros de estudos da influência da luz sobre a pele ocorreram a partir de 1891, nessa época além de avaliar a influência da luz sobre a pele, verificou-se a ação de diferentes produtos na prevenção de queimaduras solares e, em especial, a ação fotoprotetora da quinina.

Apenas a partir do século XX, foram disponibilizadas comercialmente formulações fotoprotetoras. Nos Estados Unidos, em 1928, surgiu uma emulsão contendo salicilato de benzila e cinamato de benzila e em 1935, loções contendo oleato de quinina e bissulfato de quinina. Na Austrália, em 1930, foi disponibilizado um produto contendo salicilato de fenila. Na França o primeiro produto fotoprotetor foi disponibilizado em 1936. Outro importante marco no desenvolvimento de fotoprotetores foi a patente do ácido ρ -aminobenzoico (PABA), em 1943, seguido da incorporação de derivados do ρ

aminobenzoato. Nos Estados Unidos, os militares usaram um derivado de petróleo colorido como fotoprotetor na II Guerra Mundial. Outros filtros UV incluindo o glicerol-PABA, o ETHYLHEXYL SALICYLATE, o trioleato de digaloil, o HOMOSALATE e o salicilato de dipropilenoglicol foram desenvolvidos subsequentemente. A maioria desses agentes foram direcionados para a proteção UVB, a porção do espectro solar responsável pelo efeito óbvio, a queimadura solar que incomoda a pele (ANDREASSI & ANSELMI, 2011; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007; SHAATH, 1997; LOWE, 2006).

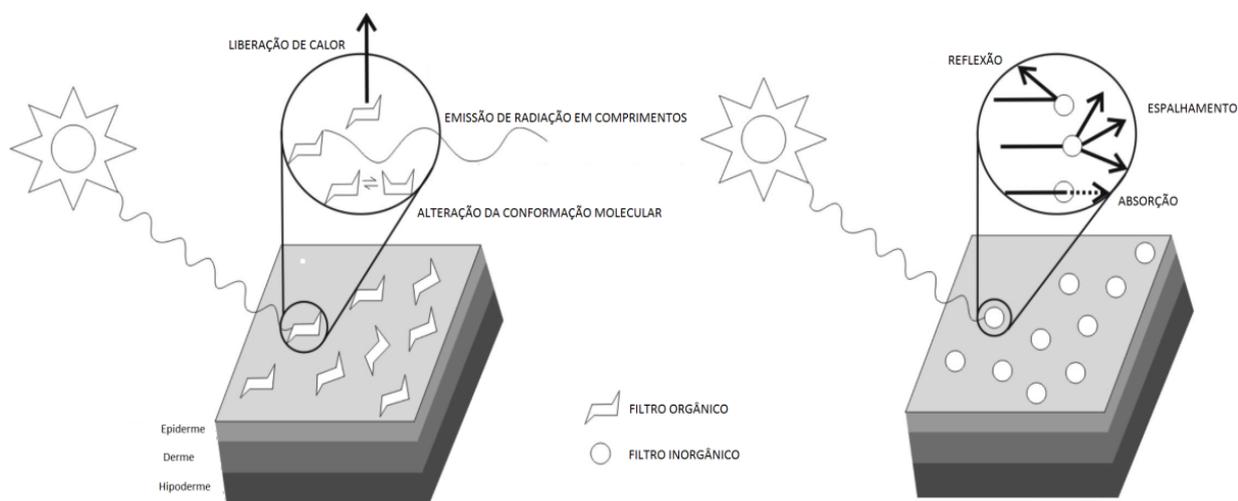
Na história recente do desenvolvimento dos fotoprotetores direcionados para a proteção à radiação UVA começou a receber maior atenção. Nos anos 80 foi desenvolvido e testado um importante filtro químico UVA o BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. A partir deste momento, a indústria desenvolveu diferentes filtros orgânicos, também denominados como químicos e os inorgânicos, conhecidos como físicos. Assim, os formuladores passaram a desenvolver fotoprotetores com diferentes combinações de filtros com o objetivo de alcançar a fotoproteção de amplo espectro, mas pesquisas posteriores sugeriram problemas de fotoinstabilidade em algumas formulações (LOWE, 2006).

Os filtros UV, orgânicos e inorgânicos, atuam de forma diferenciada na proteção dos efeitos danosos da radiação UV, descritas a seguir.

Os filtros inorgânicos são partículas que refletem, espalham ou absorvem a radiação, visível, UV e infra-vermelho, conforme apresentado na **Figura 2**. O óxido de zinco, o dióxido de titânio, o óxido de ferro, o talco e a calamina são exemplos de filtros inorgânicos, sendo que os dois primeiros são os mais utilizados nas formulações e apresentam maior fotoestabilidade (SAMBANDAN & RATNER, 2011; SHAATH, 2006; LOWE, 2006).

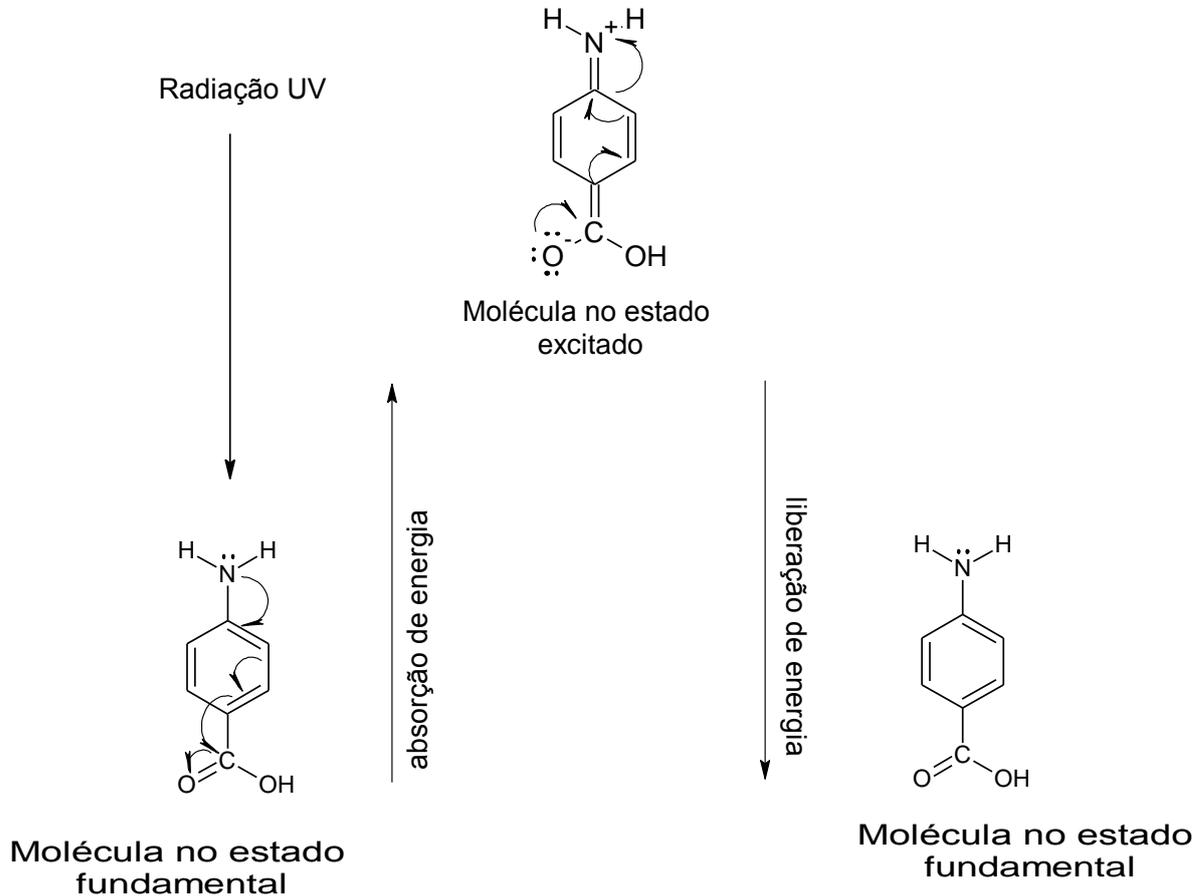
A **Figura 2** representa a forma de atuação dos filtros orgânicos e inorgânicos.

Figura 2. Forma de atuação dos filtros UV orgânicos e inorgânicos (adaptado de MANAIA *et al.* 2013).



Os filtros orgânicos são essencialmente compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático. Esta estrutura química favorece o deslocamento e transferência do grupo doador para o receptor e, conseqüentemente, absorve a radiação em diferentes regiões espectrais. A radiação UV absorvida ativa os elétrons do estado fundamental para um estado energético excitado, denominado de singlete. Quando o excesso de energia absorvida é totalmente dissipada a molécula retorna ao estado fundamental de energia. Quando a energia absorvida é dissipada parcialmente, a molécula passa do estado singlete para o tripleto de energia e somente retornará ao estado fundamental após dissipar o excesso de energia. A molécula volta ao estado fundamental emitindo energia em comprimentos de onda de menor magnitude, como o calor, fluorescência, fosforescência ou por meio de processos como a isomerização **Figura 3** (MANAIA *et al.* 2013; BONDA *et al.*, 2010; ANTONIOU *et al.* 2008; BONDA, 2008; FLOR, DAVOLOS & CORRÊA, 2007; GIOKAS, SALVADOR, CHISVERT, 2007; MAIER *et al.*, 2001; BERNEBURG *et al.*, 1999; SHAATH, 1997).

Figura 3. Deslocamento eletrônico de uma molécula absorvedora de radiação UV (adaptado de HENRIQUES, 2008; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO, 2004; WOLF *et al.*, 2001).



2.2 DESENVOLVIMENTO DE FOTOPROTETOR

Para que o fotoprotetor atue de forma efetiva na prevenção dos efeitos deletérios da radiação UV é necessário que ele agregue características de estabilidade e aceitabilidade.

As características ideais de um fotoprotetor são descritas por diferentes pesquisadores, dentre elas, destacam-se:

- promover amplo espectro de proteção contra danos agudos e crônicos induzidos pela radiação UV;
- ser estável frente a variação de temperatura e radiação UV;

- apresentar características organolépticas agradáveis ao usuário para encorajar a aplicação frequente;
- ter boa relação custo-benefício;
- possuir boa resistência à água (MANAIA, 2013; FORESTIER, 2008).

Existem diferentes classes de filtros que promovem fotoproteção em diferentes faixas de comprimento de onda e suas combinações podem alcançar amplo espectro.

Muitos filtros UV foram desenvolvidos na última década com intuito de elevar a eficácia e segurança, contudo, por razões regulatórias, as lista de filtros aprovados para o desenvolvimento de fotoprotetores pode variar de acordo com o país em questão. Nos Estados Unidos são aprovados 16 filtros UV, na Austrália 29, na Comunidade Europeia são 28 e no Brasil são 33. Além disso, as concentrações permitidas para serem incorporados nas formulações também podem variar. Essas diferenças fazem com que os desenvolvedores tenham que ter atenção especial na escolha dos filtros de acordo com mercado alvo (AUSTRALIA, 2012; MOYAL, 2012; EUROPEAN COMMISSION. HEALTH AND CONSUMERS, 2013; GUARATINI *et al.*, 2009; FORESTIER, 2008; TUCHINDA *et al.*, 2006; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

O desenvolvimento de uma combinação adequada de filtros UV e sua formulação é um processo longo e reconhecidamente empírico, sendo que a mesma proteção pode ser alcançada com concentrações diferentes de filtros. O controle do comportamento desses filtros sob exposição UV e o cuidado especial na garantia da distribuição uniforme do produto sobre a pele são importantes pontos para garantir a proteção adequada (FORESTIER, 2008, TANNER, 2006; TUCHINDA *et al.*, 2006; SCHAEFER, MOYAL & FORTANIER, 2000).

2.2.1 VEÍCULOS COSMÉTICOS/FARMACÊUTICOS

O tipo de veículo pode influenciar na eficácia de formulações fotoprotetoras, para manter a efetividade e fotoestabilidade, é importante procurar minimizar a interação dos componentes da formulação com seus princípios ativos. O veículo também determina outra característica desejável de um fotoprotetor que é a resistência à água. As formas cosméticas/farmacêuticas dos fotoprotetores incluem emulsões (loções e cremes), mousses, soluções oleosas, géis; bastões, pomadas; *sprays* e aressóis (SAMBANDAN & RATNER, 2011).

As loções e cremes consistem de emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo que apresentam viscosidade abaixo de 75.000 cps, e entre 150.000 a 500.000 cps respectivamente. No Brasil, em função do clima, o tipo de emulsão mais frequentemente utilizada é a O/A. Formulações emulsionadas permitem uma grande diversidade de tipos de apresentação. Normalmente proporcionam elevados níveis de fotoproteção pela formação de filme uniforme, espesso e não transparente sobre a pele, além disso, apresentam baixa interação com os princípios ativos. Os mousses são tipicamente emulsões adicionadas de algum tipo de propelente. (SAMBANDAN & RATNER, 2011; KLEIN, 2000).

O veículo gel, além de aquoso, tem outras formas de apresentação cosmética, como: hidroalcoólico, microemulsionado e oleoso. Apresenta alguns problemas para a formulação de fotoprotetores, como: baixa resistência à água (na forma aquosa) e, quando adicionado de álcool, para facilitar a solubilização dos filtros orgânicos, conduz a baixa fotoproteção por dificultar a formação de filme uniforme sobre a pele devido sua alta volatilidade. Além disso, pode causar ardência no local da aplicação. No entanto, esta forma é a preferida por usuários com pele oleosa ou com acne. (SAMBANDAN & RATNER, 2011; KLEIN, 2000).

Pomadas e bastões são usados para a aplicação em áreas pequenas, como os lábios ou nariz. A composição deste tipo de formulação é formada por

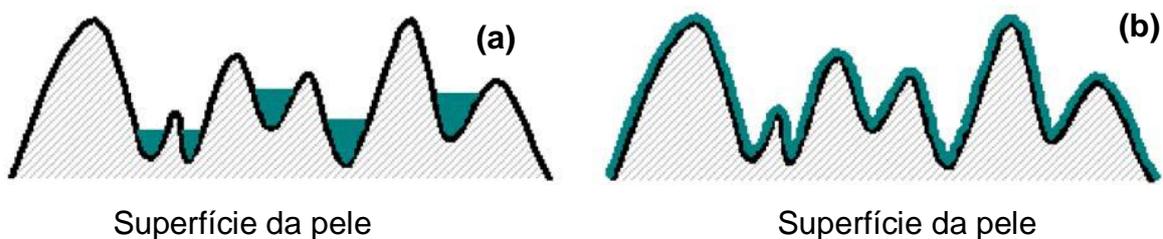
óleos, filtros solares solúveis em óleo, ceras e hidrocarbonetos derivados do petróleo (SAMBANDAN & RATNER, 2011; KLEIN, 2000).

Sprays são convenientes pela facilidade na aplicação, mas existem algumas dificuldades associadas a esta forma cosmética. Frequentemente, são formulações baseadas em componentes oleosos, o usuário não consegue verificar visualmente a aplicação e normalmente não são aplicadas quantidades suficientes de produto (SAMBANDAN & RATNER, 2011; KLEIN, 2000).

O tipo de veículo desempenha um papel importante na aceitabilidade, padrões de aplicação e adesão. A opacidade dos filtros inorgânicos e a oleosidade dos orgânicos podem contribuir para uma aplicação inadequada, e subsequente, redução da fotoproteção (BIMCZOK, *et al.*, 2006; WRIGHT, WRIGHT & WAGNER, 2001; DIFFEY & GRICE, 1997).

A distribuição do fotoprotetor é especialmente importante, pois a topografia da pele é muito variável, consiste de uma série de “picos” e “vales” (irregularidades), além disso, a camada de fotoprotetor aplicado é muito fina, menor que 0,03 mm. Estas características podem resultar em acúmulo do produto nos “vales” e pouca cobertura nos “picos”, **Figura 4**. O resultado final dessa cobertura não uniforme é que uma combinação de alto nível de filtros UV pode apresentar baixa eficácia fotoprotetora quando a formulação, de forma geral, não é desenvolvida adequadamente (TANNER, 2006).

Figura 4. Representação de uma formulação fotoprotetora aplicada sobre a pele. **(a)** formulação que não promoveu a formação de um filme uniforme sobre a pele. **(b)** formulação que promoveu a formação de filme uniforme (adaptado de TANNER, 2006).



As formulações fotoprotetoras podem ser divididas em três grandes categorias: recreacional, de uso diário e promotores de bronzeamento. Cada uma dessas categorias apresenta características particulares (SHAATH, 2005 e 2006).

Os fotoprotetores para finalidades recreacionais são desenvolvidos a partir da inclusão de diferentes filtros UV em uma grande variedade de veículos cosméticos com o objetivo de fotoproteção nas atividades de recreação desenvolvidas ao ar livre. Esses produtos são comercializados com altos níveis de FPS e contém uma carga elevada de filtros UV, fragrâncias e agentes promotores de resistência a água. O público alvo para este tipo de formulação são os bebês, crianças, adolescentes e esportistas (SHAATH, 2005 e 2006).

Os produtos de uso diário são baseados em filtros UV, antioxidantes e ingredientes naturais. São produtos multifuncionais de uso diário que simplificam os cuidados de beleza com a pele, cabelo e lábios, além de promoverem a fotoproteção (SHAATH, 2005 e 2006).

Com o objetivo de desenvolver um produto fotoprotetor efetivo que promova altos níveis de fotoproteção e resistência à água alguns cuidados devem ser observados na seleção das matérias-primas. Em especial, para a obtenção de fotoproteção elevada são citados:

- utilizar com cautela o etanol e matérias-primas não polares, como o óleo mineral, e ésteres ramificados, pois altas concentrações destas matérias-primas reduzem a fotoproteção ou deslocam o comprimento de onda máximo de absorção de fotoprotetores não polares para comprimentos de ondas mais curtos,
- escolher cuidadosamente o veículo, levando em consideração que as emulsões são responsáveis pela formação de filme mais uniforme e espesso sobre a pele e, quando necessário, adicionar formadores de filme como polímeros,
- selecionar uma combinação de filtros que promovam fotoproteção de amplo espectro (KLEIN, 2000).

Para alcançar a resistência à água deve-se preferencialmente utilizar filtros solares e matérias-primas resistentes à água, proporções elevadas da fase oleosa na emulsão O/A e quantidades reduzidas de emulsificantes hidrofílicos (KLEIN, 2000).

Para a obtenção de formulações suaves é conveniente minimizar a utilização de emulsificantes, fragrâncias e conservantes. Nesse sentido é interessante racionalizar a utilização de filtros UV de forma a alcançar a fotoproteção alvo empregando concentrações reduzidas. A utilização de ésteres de cadeias longas também pode colaborar para a elaboração de formulações de maior aceitabilidade cosmética, pois são menos irritantes que seus respectivos de cadeia curta (KLEIN, 2000).

2.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FOTOPROTETORA

A eficácia fotoprotetora pode ser determinada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Os estudos da eficácia fotoprotetora foram estabelecidos com base no Índice de Proteção estabelecido na década de 1930. Em 1956, os fotoprotetores disponíveis comercialmente foram avaliados quanto sua eficácia fotoprotetora. Foi nesse período que se iniciou o cálculo do fator de proteção. A avaliação foi feita a partir do tempo requerido para a produção de eritema na pele não protegida, usando um incremento de doses de radiação emitida por lâmpadas com emissão de radiação semelhante à radiação solar (SCHALKA & REIS, 2011).

O conceito de FPS (Fator de Proteção Solar) foi proposto originalmente pelo pesquisador austríaco Franz Greiter, em 1962 e adotado em seguida por agências regulatórias e indústrias cosméticas e farmacêuticas. Posteriormente, o mesmo pesquisador desenvolveu uma metodologia para avaliar a resistência à água. O FPS é um sistema de classificação para indicar o grau de proteção de um fotoprotetor. É definido como a razão entre a menor quantidade de radiação ultra-violeta (UVB) para produzir eritema na pele protegida (depois da aplicação de 2mg cm^{-2} de produto) e a menor quantidade de energia

necessária para provocar eritema na pele não protegida, **Equação 1** (VELASCO, *et al.*, 2011; RAI & SRINIVAS, 2007; FLOR, DAVOLOS & CORRÊA, 2007, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

$$FPS = \frac{DME(\text{pele com proteção})}{DME(\text{pele sem proteção})}$$

Equação 1. Fator de Proteção Solar.

Onde : DME é dose mínima para produzir eritema (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

O FPS é uma metodologia que avalia a proteção relacionada à radiação UVB, 1000 vezes mais eritematógena que UVA. Isso significa que produtos com alto FPS podem levar o usuário a maior exposição à radiação solar sem desenvolver eritema, porém este produto não necessariamente oferece proteção contra a radiação UVA. A fotoproteção UVA (UVAPF) é normalmente avaliada pelo método baseado na resposta da pigmentação tardia ou persistente da pele, após um período entre duas a quatro horas, frente à irradiação com 30 J cm⁻² de UVA. Este método é conhecido pela sigla PPD (*Persistent Pigment Darkening*); pois o método IPD (*Immediate Pigment Darkening*) avalia o escurecimento transitório da pele após a exposição à radiação UVA (VELASCO *et al.*, 2011; MOYAL, 2010).

Os métodos para a avaliação da fotoproteção *in vitro* foram desenvolvidos como alternativa aos métodos *in vivo*, uma vez que estes envolvem um número elevado de voluntários, além do alto custo para sua execução. A análise fotométrica de soluções diluídas e a determinação do fator da eficácia fotoprotetora por transmitância difusa têm sido empregadas amplamente (VELASCO *et al.*, 2011, EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; MOYAL, 2010; AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

A análise espectrofotométrica para a determinação do FPS é obtida por meio da leitura de soluções diluídas de filtros solares orgânicos e posterior tratamento matemático por meio da determinação da absorvância ou

transmitância ($T=10^{-Abs}$). O FPS é obtido pela **Equação 2**. No **Quadro 1** são apresentados os valores de $E(\lambda) \times I(\lambda)$ de acordo com o λ (nm) (VELASCO *et al.*, 2011; SAYRE *et al.*, 2008; MANSUR *et al.*, 1986; SAYRE *et al.*, 1979).

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Equação 2. Cálculo do FPS preconizado por MANSUR *et al.*, 1986.

Onde **FPS** = Fator de Proteção Solar; **FC** = Fator de correção (=10) ; **EE (λ)** = Efeito Eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ); **I (λ)** = intensidade de luz solar no comprimento de onda (λ); **Abs (λ)** = leitura espectrofotométrica da absorvância da formulação em solução no comprimento de onda (λ).

Quadro 1. Ponderação $E(\lambda) \times I(\lambda)$ empregada no calculo do fator de proteção solar por espectrofotometria com fator de correção igual a 10,0 (VELASCO *et al.*, 2011, SAYRE *et al.*, 1979).

λ (nm)	EE (λ) x I (λ) valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,000

Legenda - EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ); I (λ) = irradiância espectral da fonte de radiação.

A transmitância difusa permite a determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* por meio da avaliação de parâmetros como determinação do FPS, UVAPF₀, UVAPF, razão UVA/UVB e comprimento de onda crítico (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011; MOYAL, 2008).

A determinação do FPS envolve a medida da transmitância espectral dos comprimentos de onda UV entre 290 nm e 400 nm e é calculada por meio

da **Equação 3** (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011; MOYAL, 2010; PISSAVINI *et al.* 2007; RAI & SRINIVAS, 2007; DIFFEY *et al.*, 2000, SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; SAYRE *et al.*, 1979).

$$FPS \text{ in vitro} = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E(\lambda) \times I(\lambda) \times d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda)} \times d\lambda}$$

Equação 3. Determinação do FPS *in vitro* por meio da transmitância difusa (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011).

Onde: **E(λ)** = Eficácia espectral de desenvolvimento de eritema (290–320 nm); **I(λ)** = Irradiância espectral da fonte de radiação UV; **A₀(λ)** = Média da absorvância monocromática por placa do produto teste antes da exposição UV; **dλ** = resolução do comprimento de onda (1nm).

Para a avaliação da proteção UVA são considerados os cálculos UVAPF₀ e UVAPF (Avaliação da do Fator de Proteção UVA *in vitro* antes e após a exposição UV, respectivamente), razão UVA/UVB, razão FPS/UVAPF e comprimento de onda crítico, estes testes são baseados na transmitância de um filme de fotoprotetor sobre um substrato rugoso após a exposição de uma dose controlada de radiação UV, **Equações 4, 5 e 6** (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011; MOYAL 2010).

Os cálculos da avaliação do Fator de Proteção UVA *in vitro* antes da exposição UV são derivados da curva de transmitância de uma amostra não exposta à radiação UV, ponderado com o espectro de ação PPD e o espectro padrão de saída de um simulador solar UVA filtrado, após o ajuste para FPS *in vivo*, **Equação 4**.

$$UVAPF_0 = \frac{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) \times I(\lambda) \times d\lambda}{\int_{320nm}^{400nm} E(\lambda) \times I(\lambda) \times 10^{-A_0(\lambda) \times C} \times d\lambda}$$

Equação 4. Avaliação do Fator de Proteção UVA *in vitro*, medido antes da exposição UVA, UVAPF₀ *in vitro* (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011)

Onde: **P(λ)** = Espectro de ação PPD; **I(λ)** = Espectro de irradiância da fonte UV (UVA 320-400 nm para PPD); **A₀(λ)** = Média da absorvância monocromática por placa do produto teste antes da exposição a radiação UV; **C** = Fator de correção; **dλ** = resolução do comprimento de onda (1nm).

A avaliação UVAPF, proteção UVA absoluta conferida por um fotoprotetor, é calculada a partir da medida da transmitância *in vitro*, após a irradiação UV e ponderada com o espectro de ação PPD e o espectro padrão de um simulador solar com radiação UVA filtrada (**Equação 5**).

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

Equação 5. Avaliação do Fator de Proteção UVA *in vitro*, medido após exposição UVA, UVAPF *in vitro* (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; VELASCO *et al.*, 2011).

Onde: **P(λ)**, **I(λ)**, **C** e **dλ** foram definidos na **Equação 4**; **A(λ)** = Média da absorvância monocromática por placa do produto teste após exposição a radiação UV.

Outra abordagem que avalia a proteção UVA, por meio da formação de um filme fino, envolve o cálculo da razão UVA/UVB, medida relativa de UVA versus UVB e é calculada por meio **da Equação 6** que envolve a medida de absorção da formulação no intervalo entre 290 e 400 nm (VELASCO *et al.*, 2011; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

$$\frac{UVA}{UVB} = \frac{\int_{320nm}^{400nm} A\lambda \times d\lambda}{\int_{290nm}^{320nm} A\lambda \times d\lambda}$$

Equação 6. Razão UVA/UVB, calculada por meio da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB (VELASCO *et al.* 2011; RUDOLPH, 2004; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999)

Onde: $A\lambda$ = média das absorvâncias monocromáticas por placa do produto teste; $d\lambda$ = definido anteriormente na **Equação 4**.

O comprimento de onda crítico (λ_c) é aquele que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre 290 a 400 nm e é calculado de acordo com a **Equação 7**. Diante deste parâmetro, considera-se que o fotoprotetor é adequado quando este apresenta λ_c maior que 370 nm (VELASCO *et al.*, 2011; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; RAÍ & SRINIVAS, 2007; DIFFEY *et al.*, 2000, SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

O comprimento de onda crítico λ_c é calculado para placa irradiada de acordo com a **Equação 7**.

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

Equação 7. Cálculo do comprimento de onda crítico, que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre 290 e 400 nm.

Onde: $A\lambda$ = média das absorvâncias monocromáticas por placa do produto teste; $d\lambda$ = definido anteriormente na **Equação 4**.

$$Razão = \frac{FPS \text{ in vivo}}{UVAPF}$$

Equação 8. Cálculo da razão FPS, determinado *in vivo*, e fator de proteção UVA *in vitro* UVAPF.

A razão FPS/UVAPF é calculada a partir do Fator de Proteção Solar *in vivo* e o Fator de Proteção UVA *in vitro*, como descrito na **Equação 8** (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011).

Os substratos utilizados para a avaliação fotoprotetora *in vitro* devem ser opticamente transparentes no espectro UV e simular a textura e a porosidade da pele humana. Estão disponíveis: fita cirúrgica (Transpore[®] 3M), membrana de colágeno (Vitro-Skin[®] IMS), filme de policloreto de vinila (Saran Wrap[®]), placas de teflon (PTFE e placas de polimetilmetacrilato (PMMA, Helioplate[®] HD 6) (PELIZZO *et al.*, 2012; FAGEON *et al.* 2009; PISSAVINI *et al.*, 2007; DIFFEY *et al.*, 2000; SPRINGSTEEN *et al.* 1999).

Outros substratos como a epiderme de rato *hairless* e humana, além do estrato córneo fixado em cianoacrilato são citados na literatura (SAYRE *et al.* 2008; PEARSE & EDWARDS, 1993).

Para a avaliação da resistência à água o método preconizado pela COLIPA é baseado na determinação do FPS, *in vivo*, antes e depois da imersão em água que é feita em dois tempos de 20 min cada com intervalo de 15 min para secagem antes da avaliação do FPS. A porcentagem de Retenção de Resistência à Água (%RRA) é calculada de acordo com a **Equação 9** (PISSAVINI, *et al.*, 2007; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2005).

$$\%RRA = \frac{(FPS \text{ in vitro após imersão} - 1)}{(FPS \text{ in vitro antes imersão} - 1)} \times 100$$

Equação 9. Cálculo da porcentagem de Retenção de Resistência à Água (RRA).

Métodos *in vitro* para a avaliação da %RRA tem sido propostos como alternativa aos métodos *in vivo*. São baseados no método *in vivo* descrito no Guia para Avaliação de Resistência à Água de Produto Fotoprotetor, EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2005. As amostras são aplicadas

em placas e submersas em meio aquoso, mantidas sob agitação com velocidade e temperatura controladas. São realizadas avaliações da eficácia fotoprotetora *in vitro* antes e durante o teste em tempos determinados. Em estudos realizados os resultados foram reprodutíveis e apresentaram como vantagem a redução do tempo de realização e custo podem ser aplicados no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras. (AHN *et al.*, 2008; PISSAVINI *et al.*, 2007).

Os métodos para determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* preconizados pela COLIPA e FDA apresentam algumas diferenças de procedimentos, conforme descrito no **Quadro 2**, sendo que o FDA não incluiu o teste de FPS *in vitro* no documento final *21 CFR Parts 201 and 310, 2011*. Existem, também, diferenças quanto a definição de fotoprotetor amplo espectro, de acordo com a Comissão Europeia o fotoprotetor é considerado de amplo espectro quando apresenta razão de UVAPF/FPS $\geq 1/3$ determinado pelo método PPD *in vivo*, ou um grau de proteção equivalente obtido por um método *in vitro* e $\lambda_c \geq 370$ nm; o FDA considera o fotoprotetor de amplo espectro quando este apresenta FPS ≥ 15 e $\lambda_c \geq 370$ nm (UNITED STATES, 2011; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2006).

Quadro 2. Características básicas de procedimentos dos métodos EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION e UNITED STATES para a determinação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (UNITED STATES, 2011; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011).

PROCEDIMENTO	MÉTODO	
	COLIPA 2011	FDA 2011
Material da placa	PMMA	
Razão de aplicação da amostra	1,3 mg/cm ²	0,75 mg/cm ²
Limite de rejeição do coeficiente de variação entre as leituras dos pontos de uma mesma placa	50% para UVAPF <i>in vitro</i>	Não definido
Limite de rejeição do coeficiente de variação entre as placas de uma mesma amostra	20% para UVAPF <i>in vitro</i>	Não definido
Distribuição da amostra na placa	Duas fases: espalhamento rápido sem pressão (até 30 seg) e espalhamento com pressão (20 e 30 seg).	Duas fases: espalhamento suave (até 30 seg) e espalhamento com maior pressão (30 seg).
Tempo de secagem	15 min	Não definido
Número de determinações	5 pontos, 3 placas	
Área de aplicação mínima	16,0 cm ²	Não definido
Caracterização	UVAPF <i>in vitro</i> ; FPS <i>in vitro</i> , razão FPS <i>in vivo</i> /UVAPF <i>in vitro</i> , λ_c	λ_c

Legenda – **UVAPF *in vitro***: Fator de Proteção UVA, determinado *in vitro*; **FPS *in vitro***: Fator de Proteção Solar, determinado *in vitro*; **FPS *in vivo***: Fator de Proteção Solar, determinado *in vivo*; λ_c : comprimento de onda crítico, **PMMA**: polimetil metacrilato.

2.4 FOTOESTABILIDADE DE FILTROS SOLARES

Estudos sobre a fotoestabilidade de filtros solares e de produtos fotoprotetores são considerados recentes. Em meados de 1970 e início de 1980, alguns poucos estudos começaram a ser divulgados, envolvendo os benzidilenos canfora e o PABA e seus derivados. A partir dos anos 90 até

atualmente, a fotoestabilidade e, posteriormente, o desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro tem sido alvo de grande interesse entre os pesquisadores. Se a energia recebida pelos filtros UV não puder ser dissipada, as ligações químicas das moléculas absorvedoras podem ser transformadas por processos fotoquímicos, como a *trans-cis* isomerização e o ceto-enol tautomerismo. Adicionalmente podem ocorrer quebras ou rearranjos que levam a degradação como a fragmentação e a cicloadição. Como consequência desses processos pode ocorrer a perda da efetividade do fotoprotetor. Além disso, os produtos formados pelas alterações moleculares podem interagir com os excipientes da formulação ou com os componentes da pele, como o sebo, e levar a formação de novas substâncias de potencial toxicológico desconhecido (KOCKLER *et al.* 2012; GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006; SAYRE *et al.*, 2005; CHATELAIN & GABARD, 2001).

Dentre as pesquisas realizadas sobre a fotoestabilidade de filtros UV destacamos aqui aquelas que envolveram os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE de octila e a BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. Esses filtros são utilizados em larga escala para a produção de fotoprotetores de amplo espectro e sua fotoestabilidade foi avaliada em diferentes condições.

Os estudos realizados apresentam diferenças importantes quanto a dose de radiação a qual as amostras são expostas e tipo de veículo, além das diferentes combinações com outros filtros, apesar disso os resultados apresentaram coerência quanto ao comportamento desses filtros frente a radiação UV. As alterações observadas com maior frequência para o filtro ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE de octila é a diminuição da intensidade da absorção em consequência da fotoisomerização da molécula, este fenômeno é intensificado na presença da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE. O deslocamento da curva de absorção da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE para a região UVB é a principal alteração relatada e é atribuído ao deslocamento do equilíbrio ceto/enólico provocado pela radiação UV, especialmente a UVA. (HUONG *et al.*, 2008; PANGNAKORN

et al., 2007; GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006; SAYRE *et al.*, 2005; CHATELAIN & GABARD, 2001; TARRAS-WAHLBER *et al.*, 1999).

As características dos solventes empregados nos estudos de fotoestabilidade podem influenciar nos resultados obtidos. A BMBM é relativamente estável em solventes próticos, mas relativamente instável em solventes não polares e em emulsões O/A. Diluída em dioxano, acetonitrila, tetrahidrofurano, etanol, metanol e isopropanol e irradiada não apresenta alterações significativas nos espectros de absorbância. No entanto, em solventes não polares como o DMSO, hexano, heptano e ciclohexano ocorrem alterações consideradas importantes. Soluções concentradas de BMBM (2 e 4%p/p) em solventes não voláteis como o óleo mineral, o alquiltartarato, o triglicérides de ácido cáprico e caprílico, o isoestearato de estearila e o alquilacetato e avaliadas em placas de PMMA por espectrofotometria com esfera de integração, apresentam diminuição da fotoproteção *in vitro* de até 80% (HUONG *et al.*, 2008; MTURI & MARTINCIGH, 2008; CHAUDHURI *et al.* 2006).

A relevância do tema fotoestabilidade conduziu os pesquisadores em busca estratégias com a finalidade de desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro que mantenham sua capacidade de proteção frente à exposição à radiação UV. Substâncias fotoestabilizadoras como o OCTOCRYLENE, o BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE e o DIETHYLHEXYL SYRINGYLIDENE MALONATE são adicionadas aos fotoprotetoras para alcançar esta finalidade. Outras técnicas como o desenvolvimento de nanopartículas, o microencapsulamento e a complexação com cilodextrinas também foram aplicadas para elevação da fotoestabilidade do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (AL-RAWASHDEH, AL-SADEH & AL-BITAR, 2013; YANG *et al.*, 2008; CHAUDHURI *et al.*, 2006; IANNUCELLI *et al.*, 2006; PERUGINI *et al.*, 2002; CHATELAIN & GABARD, 2001).

Produtos naturais que apresentam atividade antioxidante e possuem anéis aromáticos em suas moléculas como as propiofenonas, derivados do ácido cafeico, lignanas e flavonoides são substâncias que apresentam

semelhanças estruturais aos filtros UV empregados em fotoprotetores de uso tópico. O extrato de *Kaempferia galanga* e a quercetina foram investigados quanto ao potencial de fotoestabilização de filtros UV e os resultados foram positivos (SCALIA & MEZZENA, 2010; GUARATINI *et al.* 2009; GONZALEZ, PECHKO & KALAFSKY, 2007). Os resultados obtidos por Gonzalez e colaboradores, 2007, que patentearam uma formulação de uso tópico contendo BMBM e o extrato purificado de *Kaempferia galanga* como fotoestabilizador foram obtidos pela a avaliação da fotoestabilidade de formulações contendo os filtros BMBM, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, HOMOSALATE, OCTOCRYLENE e o extrato purificado de *Kaempferia galanga*. As preparações foram expostas à radiação UV, dose de 360 kJ m⁻². A curva de transmitância foi avaliada antes e após a irradiação, sendo que a formulação que continha *Kaempferia galanga* manteve a curva de transmitância relativamente inalterada após a irradiação. Scalia & Mezzena, 2010, avaliaram o efeito de fotoestabilização da quercetina na combinação BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, 3,0% (p/p) e 4,0% (p/p), respectivamente. A degradação foi verificada pelo método CLAE (Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência). A avaliação demonstrou que as amostras expostas à radiação na ausência da quercetina apresentaram degradação de 40,3% da BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e 51,3% do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, na presença de 0,5% de quercetina a degradação foi de 27,7 e 42,2%, respectivamente (SCALIA & MEZZENA, 2010; GUARATINI *et al.* 2009; GONZALEZ, PECHKO & KALAFSKY, 2007).

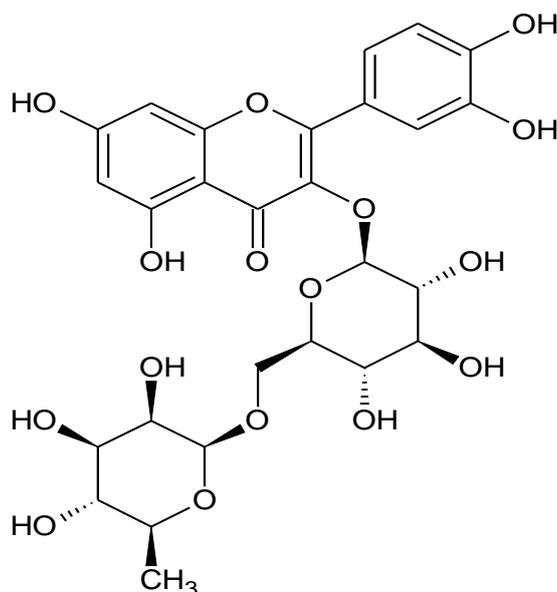
2.5 RUTINA

A rutina (3-*o*-rutinosideo-quercetina) é um composto polifenólico abundantemente encontrada e distribuída no reino vegetal. É um flavonol glicosídico que pertencente a classe flavonoides. Apresenta propriedades importantes para a saúde humana como sua atividade antioxidante. Além disso, possui atividade farmacológica de importância incluindo: antialergênica,

anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, vasoativa e antielulítica, dentre outras. Ela é considerada uma molécula não tóxica e apresenta permeabilidade cutânea reduzida. Além disso, nas plantas, os flavonoides atuam na prevenção dos danos causados pela radiação UV, como antioxidantes, inibidores enzimáticos e podem elevar a resistência contra insetos patogênicos (CHUA, 2013; ALMEIDA *et al.* 2010; BECHO, MACHADO & GUERRA, 2009; BABY *et al.* 2008; BABY, 2007; HARBONE, 1998).

A estrutura dos flavonoides está baseada em um núcleo que consiste de três anéis fenólicos e a rutina tem ligados esta estrutura básica os açúcares glicose e ramnose, **Figura 5**.

Figura 5. Representação esquemática da fórmula estrutural da rutina (BABY, 2007; BARRETO, 2005).



Como exemplo das maiores fontes comerciais de rutina temos: *Sophora japonica* L. (Fabaceae), a *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae), a *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) a *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae), *Maranta leuconeura* E. Morren (Marantaceae), *Orchidantha maxillarioides* (Ridl.) Schum (Lowiaceae), *Eucalyptus ssp.* (Myrtaceae), *Canna indica* L. (Cannaceae), *Canna edulis* Ker Gawl. (Cannaceae) e *Labisia pumila* (Blume) Mez (Primulaceae) (CHUA, 2103; NUNES *et al.*, 2012; BECHO, MACHADO & GUERRA, 2009; BABY, 2007).

Cinquenta por cento da produção mundial de rutina é proveniente *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae), conhecida popularmente como fava-d'anta, uma espécie nativa do Brasil pertencente à família *Caesalpinaceae*, encontrada em regiões de cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina. Essa árvore gera legumes carnosos, ricos em rutina e quercetina (NUNES *et al*, 2012; BECHO, MACHADO & GUERRA, 2009; BABY, 2007).

Os frutos são coletados ainda imaturos normalmente a partir do final das chuvas ou início da seca, **Figura 6** (FILIZOLA, 2013).

Figura 6. Frutos verdes da Fava D'Anta no ponto ideal de coleta (FILIZOLA, 2013).



Diante do exposto, nossa intenção nessa etapa do trabalho foi avaliar o efeito da adição da rutina na fotoestabilização de formulações fotoprotetoras contendo os filtros orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE.

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito de fotoestabilização da rutina em formulações fotoprotetoras contendo os filtros orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver formulações fotoprotetoras utilizando diferentes matérias-primas emulsificantes, contendo os filtros orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e avaliar a eficácia fotoprotetora *in vitro*.

- Avaliar o potencial de fotoestabilização de diferentes concentrações da rutina em formulações fotoprotetoras contendo os filtros orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, por meio da avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Agitador mecânico com hélice centrífuga – Fisatom[®], modelo 713D
- Balança analítica - Sartorius[®], modelo BL -210S
- Balança eletrônica - Marte[®], modelo AS2000C
- Banho termostatizado – Nova Ética, modelo 500D
- Câmara de irradiação – QLAB[®], modelo Qsun Xe-1A, com filtro Daylight-Q
- Centrífuga de bancada - Fanem[®], modelo Baby[®] I, 206 BL
- Cubeta de quartz - Hellma[®], modelo 1 cm de caminho óptico
- Dispersor ultra turrax - Ika[®], modelo T25 Basic
- Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração- LabSphere[®], modelo UV-2000S[®] UV Transmittance Analyzer
- Espectrofotômetro UV Vis – Thermo, modelo Evolution 600 UV-Vis
- Espectrometro- Bruker[®], modelo DPX300, com sonda multinuclear de 5mm
- Geladeira – Bosch[®], modelo ecoplus 370
- Micropipeta - Labsystems[®]; modelo monocanal, volume variável de 10 a 100 µL
- Micropipeta - Labsystems[®], modelo monocanal, volume variável de 100 a 1000 µL
- Placa aquecedora – Ika[®], modelo HP10
- Peagômetro - Hanna[®], modelo 8417
- Programa Minitab[®] 16.1.1 Statistical Software – Estados Unidos
- Radiômetro - QLAB[®], SOLAR Eye Irradiance System
- Sistema de osmose reversa - Gehaka[®], modelo OS10LX
- Termômetro digital - Incoterm[®], modelo tipo espeto, faixa de medição de -50 °C a 150 °C

- Tubos de vidro para análise RMN - Corning®

4.1.2 SOLVENTES

- Clorofórmio deuterado CDCl₃ (D, 99,8%) + folha de prata, com tetrametil silano – Cil, São Paulo

4.1.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

- Dimetilsulfona, grau analítico, teor 98% - Sigma Aldrich
- 2,2-difenil-1-picriidrazila (DPPH*) – Sigma Aldrich

4.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS - GRAU DE PUREZA FARMACÊUTICO

- BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM) (98,8%), DSM, São Paulo
- ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) (98,0%), Basf, São Paulo (doação)
- BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (BEMT) (98,0%), Basf, São Paulo (doação)
- Rutina (98,8%); Pharmanostra, São Paulo
- Ácido cítrico, Mapric, São Paulo
- Água deionizada, (Laboratório Farmacotécnica)
- Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado(10 OE), (Crodafos® CES), Croda, São Paulo
- Co-polímero do ácido sulfônico acriloidimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado, (Aristoflex® AVC), Pharmaspecial, São Paulo
- Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno (Phenova®), Mapric, São Paulo
- Propilenoglicol, Mapric, São Paulo
- Triglicérides de ácido cáprico (e) caprílico (Crodamol® GTCC), Mapric, São Paulo
- Trietanolamina, Mapric, São Paulo

4.1.5 OUTROS MATERIAIS

- Bisnagas plásticas – Apacê[®], em polietileno, capacidade 30 g
- Potes plásticos – Apacê[®], em polietileno, capacidade 200 g

4.2 MÉTODOS

4.2.1. DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

Foram formuladas sete emulsões baseadas em diferentes concentrações da base autoemulsificante de ésteres fosfatados (e) alcoóis graxos e concentrações fixas dos outros componentes e dos filtros solares orgânicos BMBM 5,0% (p/p) e EHMC 10,0% (p/p), com objetivo de se avaliar a influência desse componente da formulação na eficácia fotoprotetora *in vitro*, **Tabela 1**.

Foram preparadas 100 g de cada formulação, em duplicata e a técnica envolveu as etapas descritas a seguir:

FASE A - O co-polímero do ácido sulfônico acrilóildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado, de acordo com as quantidades equivalentes (%p/p), indicadas na **Tabela 1**, foram hidratados em água e propilenoglicol, sob agitação de 1000rpm, em agitador mecânico, com hélice tipo centrífuga, durante 10 min e, posteriormente, foram aquecidos a 75,0 °C (CLARIANT, 2001).

FASE B - Os componentes álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado (10 OE); triglicérides de ácido cáprico (e) caprílico e os filtros orgânicos BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, de acordo com as quantidades equivalentes (% p/p), indicadas na **Tabela 1**, foram aquecidos à temperatura de 75,0 °C.

PROCESSO DE EMULSIFICAÇÃO

A **Fase B** foi vertida lenta e constantemente sobre **A** sob agitação de 1000rpm, em agitador mecânico, com hélice dentada. Após, a velocidade foi elevada gradualmente até 5000 rpm e mantida por 2 min. O conservante foi adicionado durante a agitação (BABY, 2007; PINTO, 2004; PRISTA *et al.*, 1995). O pH da formulação foi ajustado para $6,0 \pm 0,5$ com trietanolamina e/ou solução de ácido cítrico 10% p/p, quando necessário (BABY, 2007). As formulações foram resfriadas à temperatura ambiente e acondicionadas em potes de plástico com capacidade de 200 g (ANSEL *et al.*, 2000).

Tabela 1. Composição quali e quantitativa (%p/p) das emulsões avaliadas no *Teste de Estabilidade Preliminar (1 a 7)*, codificados como segue:

Componentes	Identificação das formulações						
	C2	C4	C6	A0,5	C2A0,5	C4A0,5	C6A0,5
Triglicérides de ácido cáprico e caprílico (CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE*)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Propilenoglicol (PROPYLENE GLYCOL*)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado (10 OE) (CETEARYL ALCOHOL (AND) DICETYL PHOSPHATE (AND) CETETH-10 PHOSPHATE*)	2,0	4,0	6,0	-	2,0	4,0	6,0
Co-polímero do ácido sulfônico acrilóil-dimetilaurato e vinilpirrolidona neutralizado (AMMONIUM ACRYLOYLDIMETHYLTAURATE/VP COPOLYMER*)	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno (PHENOXYETHANOL (AND) METHYLPARABEN (AND) ETHYLPARABEN (AND) BUTYLPARABEN (AND) PROPYLPARABEN (AND) ISOBUTYLPARABEN*)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
BMBM (BUTYL METHOXYDIBENZOILMETANO*)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
EHMC (ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE*)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Água deionizada (ACQUA*)	q.s.p. 100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Legenda: - = componentes não adicionados; (*) = INCI Name - International Nomenclature of Cosmetic Ingredient (BRANDÃO, 2009); **BMBM**= BUTYL METHOXYDIBENZOILMETHANE; **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

4.2.2 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

As formulações, preparadas em duplicata, foram submetidas ao *Teste de Estabilidade Preliminar*, após 48 horas da preparação, a fim de finalizar o processo de emulsificação. O objetivo foi identificar processos de instabilidade como cremeação, sedimentação, floculação e separação de fases, adicionalmente às propriedades organolépticas consideradas inadequadas, segundo critérios do formulador e, também, referendadas pela literatura. Os resultados desta análise permitiram selecionar as formulações de maior estabilidade macroscópica, (BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; FOSTER & RYBINSKI, 1998).

4.2.2.1 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO – CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Foi adotada a seguinte nomenclatura para classificar as características de homogeneidade e cor das formulações avaliadas (BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; MAIA, 2002):

HOMOGENEIDADE

N – Normal, sem alterações (homogêneo)

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

M – Modificado (alterações caracterizadas de separação de fase)

COR

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

LM – Levemente Modificada (apresentou leve modificação visual)

M – Modificada (apresentou intensa modificação visual)

Foram excluídas das próximas etapas as formulações que apresentaram alterações de homogeneidade e cor classificadas como Modificada (**M**) para um ou ambos os testes, centrifugação e estresse térmico, ou ainda, aquelas que apresentaram alterações classificadas como Levemente Modificada (**LM**) para ambos os testes.

4.2.2.2 CONDIÇÕES

Após o preparo, as formulações foram acondicionadas em potes plásticos e mantidas em repouso por 48 horas (tempo 0) e, posteriormente, avaliadas como descrito a seguir:

a) CENTRIFUGAÇÃO

Aproximadamente dez gramas de cada formulação foram submetidas ao teste de centrifugação durante trinta minutos, a 3000 rpm (210G) (BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; ROLAND *et al.*, 2003).

b) ESTRESSE TÉRMICO

Aproximadamente, dez gramas de cada formulação foram transferidas para tubos de vidro e levadas ao banho termostatizado. O ensaio foi realizado no intervalo de temperatura entre 40,0 e 80,0 °C. A elevação da temperatura foi efetuada de 10,0 em 10,0 °C, mantendo-se as amostras por 30 min em cada valor. As formulações foram mantidas em repouso e avaliadas após atingirem a temperatura ambiente (BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; ROLAND *et al.*, 2003).

c) EFICÁCIA FOTOPROTETORA *IN VITRO*

As formulações consideradas aprovadas na triagem das formulações *Teste de Estabilidade Preliminar* foram caracterizadas quanto à eficácia fotoprotetora *in vitro*, utilizando-se a espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.

Alíquotas das amostras desenvolvidas no item 4.2.1 e aprovadas no *Teste de Estabilidade Preliminar*, item 4.2.2, foram aplicadas uniformemente, sob a forma de filme de 0,75 µg cm⁻² em movimentos circulares sobre a superfície do substrato, de polimetilmetacrilato (PMMA) (Helioplate[®] HD 6), medida 5 x 5 cm, de maneira padronizada. Os registros dos valores espectrofotométricos da transmitância foram realizados em intervalo de comprimento de onda entre 290 e 400nm, na taxa de progressão de 1,0nm. Foi considerada a média das

leituras de três placas para cada amostra, sendo que foram realizadas nove leituras em pontos diferentes para cada placa, considerado como limite máximo do coeficiente de variação de 20% entre os pontos. Os parâmetros avaliados foram FPS *in vitro*, λ_c e razão UVA/UVB. (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; UNITED STATES, 2011; VELASCO *et al.*, 2011; DIFFEY *et al.*, 2000; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999).

4.2.3 AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE DAS EMULSÕES

As formulações que apresentaram resultados de FPS ≥ 15 e comprimento de onda crítico ≥ 370 nm no teste de avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro*, foram submetidas à avaliação da fotoestabilidade e a razão UVA/UVB não foi considerada na escolha das formulações para a próxima etapa. Após avaliação inicial, como descrito no item 4.2.2, as amostras selecionadas foram irradiadas com a dose de 192 kJ m^{-2} , irradiância $209,2 \text{ W m}^{-2}$, faixa de 300 e 800 nm, padronizada por radiômetro. A temperatura foi mantida a $37,0 \pm 2,0^\circ \text{ C}$. As análises foram efetuadas antes e após a exposição a irradiação das amostras seguindo a técnica descrita em 4.2.2.

4.2.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DA RUTINA NA FOTOESTABILIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA CONTENDO BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE E ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

A partir dos resultados obtidos no *Teste de Estabilidade Preliminar*, foi selecionada a formulação de melhor desempenho, considerando-se a os resultados do FPS ≥ 15 , comprimento de onda ≥ 370 nm crítico, que caracterizam uma formulação fotoprotetora de amplo espectro, de acordo com as definições do UNITED STATES e EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011. Esta foi utilizada como base para avaliar a influência da rutina, em diferentes níveis de concentração, na fotoestabilização da combinação do **BMBM e EHMC**, **Tabela 2**. A associação da rutina e do filtro BMBM foi baseada no planejamento fatorial, *DOE* 3^k três níveis e duas variáveis, a concentração do **EMHC** foi mantida em 10% p/p, **Tabela 3**, as

análises foram efetuadas em réplica de três (MOYAL, 2013; EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011; UNITED STATES, 2011; BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).

A **Tabela 2** apresenta a codificação utilizada para o planejamento fatorial e a **Tabela 3** o planejamento fatorial *DOE 3^k*, dois fatores, e três níveis, aplicado para a avaliação da influência da rutina na fotoestabilização da mistura dos filtros UV **BMBM** e **EHMC** veiculados em emulsão O/A (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).

As formulações foram preparadas de acordo com o item 4.2.1, com alteração da *FASE A* como descrito a seguir: a rutina foi adicionada à água e ao propilenoglicol, na proporção de 0,1 ou 1,0% p/p. O pH foi ajustado para o valor de $9,0 \pm 0,5$ (trietanolamina), a temperatura foi mantida a $70,0^{\circ} \text{C}$, sob agitação manual, com o objetivo de facilitar a solubilização da rutina, após total solubilização o processo seguiu os mesmos procedimentos descritos em 4.2.1.

As amostras foram avaliadas quanto à fotoestabilidade conforme descrito no item 4.2.3.

Tabela 2. Codificação utilizada para o planejamento fatorial das formulações fotoprotetoras em três níveis de concentração (proporção % p/p) dos componentes ativos.

Codificação (níveis)	Componente ativo (fatores)	
	R	BMBM
	Proporção (% p/p)	
-	0	0
0	0,1	2,5
+	1,0	5,0

Legenda: - =concentração mínima; 0 =concentração intermediária; + = concentração máxima; **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina

Tabela 3. Planejamento fatorial *DOE 3^k*, para a avaliação da influência da rutina na fotoestabilização da mistura dos filtros UV BMBM e EHMC veiculados em emulsão O/A (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).

Experimentos	BMBM	R
1	-	-
2	-	0
3	-	+
4	0	-
5	0	0
6	0	+
7	+	-
8	+	0
9	+	+

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; - = concentração mínima; 0 = concentração intermediária + = concentração máxima

Os resultados do planejamento fatorial foram avaliados pelo programa Minitab 16.1.1 para determinar resultados estatisticamente significativos, considerando $n=3$ e $p<0,05$.

4.2.4.1. AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE – RADIAÇÃO SOLAR NATURAL

As fontes de irradiação UV, bem como doses e irradiâncias utilizadas em estudos sobre fotoestabilidade de filtros orgânicos relatadas na literatura são variáveis e dificultam a comparação dos resultados obtidos nos experimentos (SCALIA & MEZZENA 2010; MOYAL, 2010; GONZALEZ, PECHKO & KALAFSKY, 2007; GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006). Após a avaliação da fotoestabilidade das formulações expostas a uma fonte de radiação UV artificial, como descrito em 4.2.3.

A seleção das amostras para teste foi baseada nos resultados da avaliação da influência da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE. Além disso, para efeito de comparação, uma formulação contendo os dois filtros e adicionada do fotoestabilizador BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (**BEMT**) na concentração de 5,0% (p/p), identificada como **BEMT5**, também foi avaliada. Esse fotoestabilizador foi selecionado baseado nos resultados de fotoestabilização obtidos por Chatelain & Gabard, 2001.

As formulações foram aplicadas em placas de PMMA e avaliadas quanto ao FPS *in vitro*, λ_c e razão UVA/UVB, como descrito em 4.2.3, antes e após a exposição a radiação. As amostras foram expostas horizontalmente por 40 min, na cidade de São Paulo. O horário de início da exposição das amostras foi às 12:00 horas, do dia 20 de agosto de 2013. As leituras foram realizadas a cada 10 min. A irradiância média registrada para o dia pelo Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, foi entre 140 e 160 W m⁻², pelo modelo Global 1.2, que considera a radiação UV e infravermelho, a partir de imagens captadas pelo satélite Goes 13, levando em conta parâmetros atmosféricos como água precipitável, conteúdo de ozônio e carga de aerossol, **Figura 7** (CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013; CEBALLOS & BOTTINO, 2002).

O índice UV (IUV) para o horário da exposição das amostras foi **7** (**Figura 8**). Este índice é uma medida da intensidade da radiação UV incidente

sobre a superfície da Terra e representa o valor máximo diário da radiação ultravioleta. Esses valores são agrupados em categorias de intensidade que variam de menor que 2 (baixo) até maior que 11 (extremo). O IUV é obtido pela **Equação 10**, cada unidade de IUV corresponde a 25 mW m⁻² (CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013; CORRÊA, 2003 e 2013).

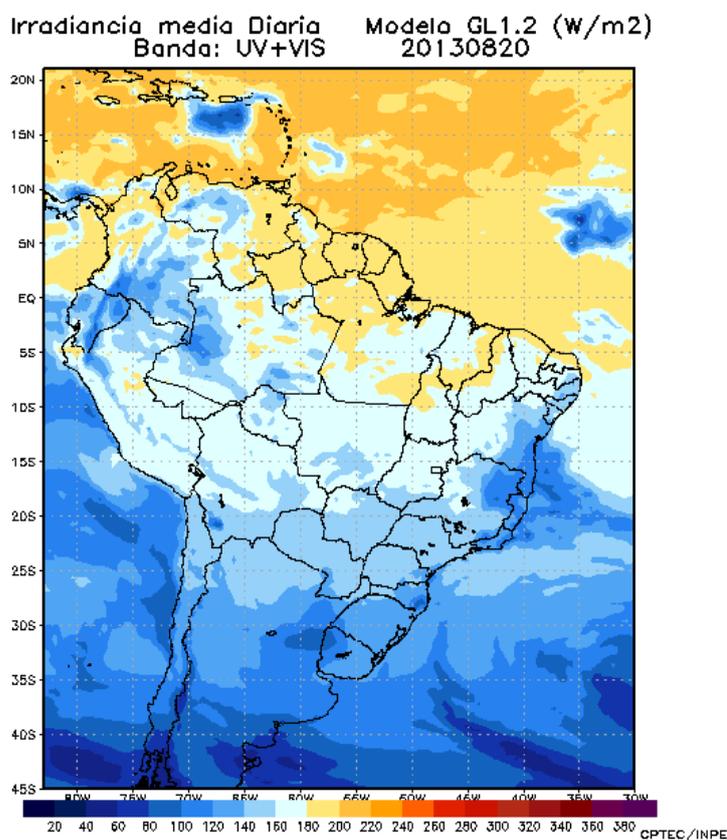
$$IUV = C \int_{280nm}^{400nm} E_{\lambda} \epsilon_{\lambda} d \lambda$$

Equação 10. Cálculo do Índice UV

Onde: **IUV** = Índice Ultra Violeta; **C**= Constante de conversão equivalente a 40 W m⁻²; **E_λ** = irradiância espectral em superfície (W m⁻² nm⁻¹); **ε_λ** = espectro de ação eritêmica (CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013, CORREA, 2003 e 2013)

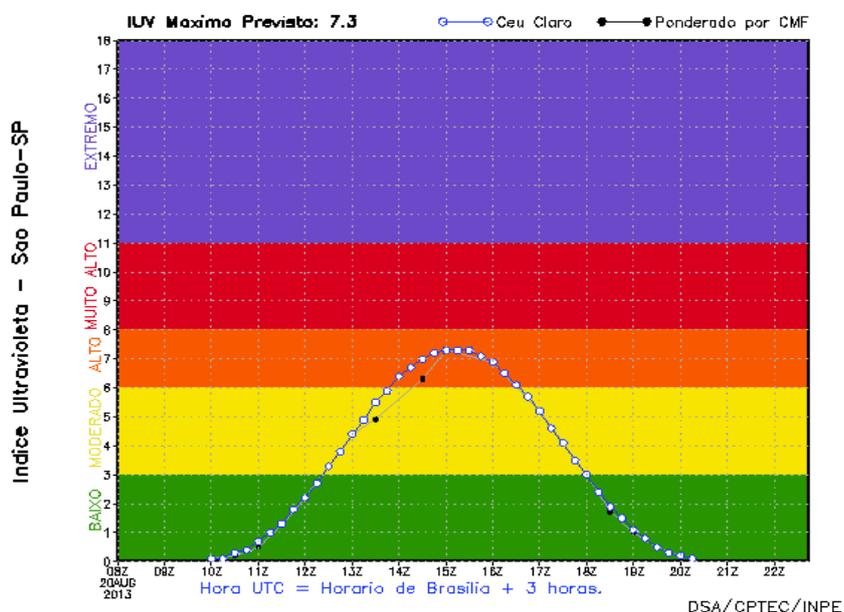
As **Figuras 7** e **8** representam a irradiância média para o dia de exposição das amostras e o Índice UV de acordo com o horário.

Figura 7. Irradiância média no Brasil em 20 de agosto de 2013. Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, 2013.



Legenda: **MODELO GL1.2** = modelo global (físico), versão 1.2, que considera a radiação UV e infravermelho, a partir de imagens captadas pelo satélite Goes 13 (Fonte: CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013)

Figura 8. Índice Ultra Violeta, na cidade de São Paulo, em 20 de agosto de 2013, horário GMT. Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, 2013.



Legenda: **IUV** = Índice Ultra Violeta; **Hora UTC** = *Universal Time Coordinated* (Tempo Universal Coordenado); **DSA** = Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais; **CPTEC** = Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos; **INPE** = Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; **CMF** = *Cloud Modification Factor* (CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013, CORREA, 2003) (Fonte: CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, 2013)

4.2.5 TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA

A partir dos resultados obtidos na etapa da avaliação da influência da rotina na fotoestabilização da formulação fotoprotetora contendo BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE foi selecionada a formulação com a combinação dos dois filtros (BMBM e EHMC) com a rotina que apresentou melhor desempenho quanto a este parâmetro. Para efeito de comparação, esta formulação foi submetida o *Teste da Estabilidade Acelerada*, juntamente com a formulação que continha apenas os dois filtros, sem fotoestabilizador e outra formulação, que continha os dois filtros e o fotoestabilizador BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE (**BEMT**), na concentração de 5,0% (p/p), identificada como **BEMT5**.

As formulações foram preparadas seguindo os procedimentos descritos em 4.2.1, para as formulações isentas de rotina e 4.2.4 para as formulações que continham rotina.

Este teste foi realizado com intuito de verificar o surgimento de sinais de instabilidade nas formulações, como separação de fases, alteração de pH e perda da funcionalidade e, a partir dessas informações, selecionar a formulação de melhor desempenho. Para isso as amostras foram submetidas as seguintes condições por período de 15 dias, como segue:

- temperatura elevada: **$45,0 \pm 2,0$ °C**;
- baixa temperatura: **$5,0 \pm 2,0$ °C**;
- ambiente, sob influência da radiação solar direta e indireta, à temperatura ambiente (**$20,0 \pm 5,0$ °C**).

As formulações também foram submetidas a ciclos de **24 horas a $45,0 \pm 2,0$ °C** e **24 horas a $-5,0 \pm 2,0$ °C**, durante o período de doze dias (seis ciclos) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As amostras foram acondicionadas em réplicas de três, em bisnagas de polietileno com capacidade de 30,0g, a embalagem foi preenchida até aproximadamente dois terços de sua capacidade total para permitir possíveis trocas gasosas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As análises foram iniciadas após 48 horas de preparação das amostras, considerado como tempo 0 (**t_0**), e ao final do período estabelecido para cada condição (**t_{final}**).

As condições de baixas temperaturas como 5,0 °C e -5,0 °C podem provocar a separação de fases das emulsões ou acelerar a precipitação de princípios ativos. Temperaturas elevadas, como 45,0 °C, podem acelerar a velocidade dos processos físico-químicos e das reações químicas podendo afetar características como a viscosidade e o pH, além de elevar a velocidade de degradação química dos componentes da formulação. A condição ciclo com a alternância de temperaturas baixa e elevada (24 horas a 45,0 °C e 24 horas a - 5,0 °C) pode produzir instabilidade mais rapidamente comparada a

temperatura constante (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008; PINTO, 2004; RIBEIRO, KHURI & GOTTARDI, 1996).

4.2.5.1 PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE ACELERADA

As amostras foram avaliadas quanto as características organolépticas homogeneidade e cor como descrito em 4.2.2.1. Os parâmetros físico-químicos e funcionais foram analisados, conforme descrito em 4.2.5.1.1 e 4.2.5.1.2 e os filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** foram quantificados por qRMN, pelo método validado no Capítulo 1 deste trabalho.

4.2.5.1.1 PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICO - pH

O pH foi determinado por potenciometria, pela imersão do eletrodo de vidro com diafragma de junção esmerilhada, adequado para emulsões, previamente calibrado. As análises foram efetuadas em triplicada a temperatura ambiente $20,0 \pm 2,0$ °C (MORAES, 2012, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

4.2.5.1.2 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE

As formulações foram avaliadas quanto a atividade antirradicalar e fotoestabilidade.

a) ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

O método empregado para avaliar a atividade antirradicalar das formulações foi baseado na redução do radical 2,2-difenil-1-picriidrazila (DPPH*) em solução de metanol. A solução com esse radical apresenta coloração púrpura com absorção máxima entre 515 e 528 nm, que é alterada pela redução do radical e permite o monitoramento espectrofotométrico.

As formulações foram solubilizadas em metanol na concentração de $0,1 \text{ g mL}^{-1}$, centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em 2,5 mL de DPPH* (100 μM) e homogeneizada. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz por 20 min, à temperatura ambiente ($20,0 \pm 2,0$ ° C). Após este período, a redução do radical

livre DPPH• foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 517 nm. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. O controle negativo era composto por 2,5 mL de DPPH• (100 µM) e 0,5 mL de metanol P.A. Como branco foi utilizado o solvente metanol P.A. (MORAES, 2012; BALOGH, 2011; BRAND-WILLIAMS, BONDET & BERSET, 1997).

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH• de acordo com a **Equação 11** (MORAES, 2012; BRAND-WILLIAMS, BONDET & BERSET, 1997; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI & SAURACALIXTO, 1998).

$$\% \text{ de inibição do DPPH}^\bullet = \frac{(\text{Abs controle negativo} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle negativo}} \times 100$$

Equação 11. Cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH• (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1997)

Onde: **Abs controle negativo** = Absorbância da solução não adicionada da amostra; **Abs amostra** = Absorbância da amostra

b) FOTOESTABILIDADE DAS EMULSÕES

As emulsões foram avaliadas quanto a fotoestabilidade conforme descrito em 4.2.3.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS REALIZADOS

A análise estatística dos resultados obtidos em cada ensaio foi realizada no Programa Minitab 16.1.1. Para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com melhor desempenho (de acordo os valores médios n=3) foram utilizados como ferramenta a análise de variância (ANOVA one-way) e, quando apropriado, o Teste de Múltipla Comparação de Tukey (BABY,2007).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE ESTABILIDADE PRELIMINAR

Foram desenvolvidas 7 formulações compostas por variações da concentração da base auto-emulsificante de ésteres fosfatados (e) alcoóis graxos com concentrações fixas dos outros componentes da formulação e dos filtros solares orgânicos BMBM 5,0% (p/p) e EHMC 10,0% (p/p).

Após o *Teste de Estabilidade Preliminar* das formulações, procedeu-se a avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro*, conforme descrito no item 4.2.2.2 para as formulações que não apresentaram modificações, consideradas normais (N), ou com leves modificações (LM), em somente um dos testes (centrifugação ou estresse térmico) de acordo com o item 4.2.2.1.

O *Teste de Estabilidade Preliminar* das formulações forneceu dados importantes sobre a estabilidade das emulsões desenvolvidas. Na **Tabela 4** são apresentados os resultados dos Testes de Centrifugação, Estresse Térmico e Eficácia Fotoprotetora *in vitro*.

Tabela 4. Avaliação do aspecto e cor das formulações contendo BMBM 5% (p/p) e EHMC 10%(p/p) durante o *Teste de Estabilidade Preliminar* e avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações aprovadas. Variações das combinações e concentrações do co-polímero pré-neutralizado e da base autoemulsificante de ésteres fosfatados (e) alcoóis graxos.

Formulação	Homogeneidade		Cor		Eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> *					
	C	ET	C	ET	FPS <i>in vitro</i>		λ_c		Razão UVA/UVB	
					Antes	Pós-irrad	Antes	Pós-irrad	Antes	Pós-irrad
C2	LM	M	N	N	-	-	-	-	-	-
C4	N	M	N	N	-	-	-	-	-	-
C6	LM	M	N	N	-	-	-	-	-	-
A0,5	M	N	N	N	-	-	-	-	-	-
C2A0,5	N	N	N	N	13,5	8,5	381,0	379,5	0,741	0,701
C4A0,5	N	N	N	N	14,0	8,5	380,0	379,0	0,721	0,706
C6A0,5	N	N	N	N	15,5	9,0	379,0	377,5	0,692	0,665

Legenda: **C** = Centrifugação; **E T** = Estresse Térmico; **Aspecto: N** = Normal, sem alteração; **LM** =Levemente Modificado ; **M** = Modificado; **Cor: N** = Normal, sem alteração; **FPS** = Fator de Proteção Solar ; λ_c - Comprimento de onda crítico; - =Formulação não avaliada por não ter sido aprovada na *Avaliação Preliminar da Estabilidade*, * = média de duas determinações; **pós-irrad** = pós irradiação.

A partir dos resultados do Teste de Estabilidade Preliminar das formulações e da avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro*, foi selecionada a formulação base para ser utilizada na exploração da influência da rotina na fotoestabilidade dos filtros orgânicos BMBM e EHMC. Foram excluídas aquelas que apresentaram modificações de homogeneidade e/ou cor durante o teste, pois representavam sinais de instabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Todas as formulações compostas somente pela base autoemulsificante de ésteres fosfatados (e) alcoóis graxos ou somente o co-polímero pré-neutralizado como agentes emulsificantes (**C2; C4; C6 e A0,5**), em todas as proporções avaliadas, apresentaram separação das fases aquosa e oleosa, quando submetidas aos testes de centrifugação e/ou estresse térmico, que é um teste de triagem na escolha das formulações de melhor desempenho (**TABELA 4**). Este resultado indicou que, sob as condições do experimento, estes agentes emulsificantes isolados não foram capazes de proporcionar uma emulsificação adequada para manter a estabilidade da formulação. As formulações que não apresentaram modificações foram submetidas a avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (**C2A0,5; C4A0,5 e C6A0,5**).

Diante dos resultados da avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* foram eliminadas das as próximas etapas do estudo, as formulações que apresentaram valores de FPS *in vitro* abaixo de 15. Esse parâmetro, juntamente com o limite mínimo de 370 nm de comprimento de onda crítico, distingue formulações fotoprotetoras que não preenchem os requisitos mínimos para serem consideradas de amplo espectro. O FDA, baseado em estudos realizados sobre os efeitos do uso de fotoprotetores, concluiu que, o uso de fotoprotetores, quando de amplo espectro, ou seja, $FPS \geq 15$ e λ_c 370 nm, pode colaborar para a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer de pele e o envelhecimento cutâneo precoce, quando associado a limitação do tempo de exposição a radiação UV e uso de roupas protetoras (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011, UNITED STATES, 2011; WANG & LIM, 2011, VELASCO *et al*, 2011).

Foram analisadas as formulações **C2A0,5; C4A0,5 e C6A0,5** e todas apresentaram λ_c acima de 370 nm, porém somente as **C6A0,5** resultou em FPS

≥ 15. Foi possível observar uma tendência de elevação do valor do FPS de acordo com a elevação da concentração do componente emulsificante álcool cetearílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado (10 OE). Preparações emulsionadas normalmente proporcionam elevados níveis de fotoproteção pela formação de filme mais uniforme, espesso e não transparente (SAMBANDAN & RATNER, 2011; KLEIN, 2000).

Modificadores de reologia podem interagir de forma positiva em formulações fotoprotetoras atuando como auxiliares na obtenção elevados valores de FPS. Em um estudo sobre a influência do veículo na variação do FPS *in vivo*, pesquisadores relacionaram a viscosidade e o comportamento reológico dos veículos com o desempenho fotoprotetor. Aqueles compostos por bases fosfatadas não foram estáveis, apresentaram baixa tixotropia e maior FPS, ao contrário dos veículos compostos por bases não iônicas que apresentaram elevada tixotropia e estabilidade, porém com menor FPS. A combinação da base fosfatada com um polímero cruzado apresentou o mesmo valor de FPS do veículo composto somente pela base fosfatada, elevada tixotropia e maior estabilidade (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2003). Segundo Tanner, 2006, a distribuição do fotoprotetor é especialmente importante para a determinação do FPS *in vivo*, pois a topografia da pele é muito variável e consiste em uma série de “picos” e “vales”, indicando não uniformidade. Características que podem resultar em acúmulo do produto nos “vales” e pouca cobertura nos “picos” (TANNER, 2006). Nesta etapa do trabalho, o aspecto do comportamento reológico não foi avaliado, mas uma possível explicação para o resultado diferenciado para o FPS, de acordo com as variações da concentração do componente emulsificante seria justamente a influência da reologia no valor de FPS. Na avaliação do FPS *in vitro* as formulações foram aplicadas em placas de PMMA, que também apresentam rugosidade e podem causar o mesmo efeito descrito por Tanner, 2006, com o acúmulo do produto nos vales e pouca cobertura nos picos, no caso das formulações que apresentaram os menores valores de FPS.

Após a irradiação todas as amostras avaliadas, **C2A0,5**; **C4A0,5** e **C6A0,5**, ocorre a diminuição do FPS *in vitro* para valores abaixo de 15, mas o λ_c , acima de 370 nm foi mantido. A diminuição da efetividade após a irradiação das

amostras era um resultado esperado de acordo com as características dos filtros utilizados que são reconhecidamente fotoinstáveis. A seleção da formulação para a próxima etapa do trabalho foi baseada nos resultados da avaliação da eficácia fotoprotetora antes da irradiação das amostras, sendo assim, a formulação **C6A0,5**, que continha a maior concentração do componente emulsificante (álcool cetarílico (e) fosfato de dicetila (e) fosfato de álcool cetílico etoxilado (10 OE) foi selecionada como base para a avaliação da influência da rotina na fotoestabilização de formulações contendo a combinação dos filtros BMBM e EHMC.

A razão UVA/UVB é baseada na medida relativa da absorbância UVA/UVB após a aplicação do produto no substrato, eliminando a necessidade de uma medida absoluta da absorbância que é relatada como muito do operador. Atualmente, o FDA e COLIPA não preconizam este teste para a avaliação do espectro de proteção da formulação, pois o aumento da razão pode significar a diminuição da concentração dos componentes que absorvem na região UVB e UVA II (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION, 2011). Este parâmetro não foi eliminatório nesta etapa, mas todas as formulações avaliadas apresentaram resultados entre 0,692 e 0,741; valores classificados como boa proteção, de acordo com a primeira versão de classificação proposta pela companhia Boots, o sistema Boots Star Ratio. Avaliando-se os resultados após a irradiação das amostras foi observada diminuição da razão UVA/UVB de no máximo 5,4%. A variação foi considerada aceitável, uma vez que as formulações se mantiveram dentro da mesma classificação, que varia de 0,61 a 0,8 (MOYAL, 2008; 2010).

5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DA ROTINA NA FOTOESTABILIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA CONTENDO BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE E ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

Após a seleção da formulação base por meio da avaliação dos resultados do *Teste de Estabilidade Preliminar* e da eficácia fotoprotetora *in vitro* procedeu-se a avaliação da influência da rotina na fotoestabilização da formulação fotoprotetora contendo os filtros **BMBM** e **EHMC**. A adição da

rutina, bem como do filtro BMBM, obedeceu ao planejamento fatorial *DOE 3²* (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005).

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial são apresentados nas **Tabelas 5 a 8** e **Figuras 9 a 11**. Os parâmetros avaliados foram: *FPS in vitro*, λ_c e razão UVA/UVB.

Tabela 5. Avaliação da influência da rutina no **FPS *in vitro*** de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.

IDENTIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	FPS <i>in vitro</i>		MANUTENÇÃO DO FPS PÓS-IRRAD (%)
	ANTES	PÓS-IRRAD	
BMBM- R-	7,3 ±0,6	5,7±0,6	77,4±7,4
BMBM- R0	6,0±1,0	6,0±1,0	100,00±0,0
BMBM- R+	9,3±0,6	8,7±0,6	93,0±6,1
BMBM0 R-	12,3±0,6	6,0±0,0	48,7±2,2
BMBM0 R0	13,7±1,2	10,7±0,6	78,3±5,8
BMBM0 R+	13,3±0,6	9,7±0,6	72,5±4,0
BMBM+ R-	16,7±1,5	9,0±1,0	53,9±1,4
BMBM+ R0	18,3±1,5	12,0±0,0	65,8±5,4
BMBM+ R+	16,0±1,0	11,3±1,2	70,8±4,2

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM -** = BMBM 0% (p/p); **BMBM0** = BMBM 2,5% (p/p); **BMBM+** = BMBM 5,0% (p/p); **R -** = Rutina 0% (p/p); **R0** = Rutina 0,1% (p/p) e **R+** = Rutina 1,0% (p/p). **FPS *in vitro*** = média de 3 determinações ± desvio padrão; **IRRAD** = Irradiação.

Tabela 6. Avaliação da influência da rutina no λ_c de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.

IDENTIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	λ_c		MANUTENÇÃO DO λ_c PÓS-IRRAD (%)
	ANTES	PÓS-IRRAD	
BMBM- R-	336,0±1,0	335,0±0,0	99,7±0,3
BMBM- R0	345,0±9,5	338,3±2,3	98,1±2,0
BMBM- R+	347,3±2,5	352,3±1,5	101,4±0,3
BMBM0 R-	376,7±0,6	370,7±0,6	98,4±0,0
BMBM0 R0	377,7±0,6	374,7±0,6	99,2±0,3
BMBM0 R+	377,7±0,6	373,0±0,0	98,8±0,2
BMBM+ R-	380,0±0,0	379,0±0,0	99,7±0,0
BMBM+ R0	381,0±0,0	379,0±0,0	99,5±0,0
BMBM+ R+	382,0±0,0	379,0±0,0	99,2±0,0

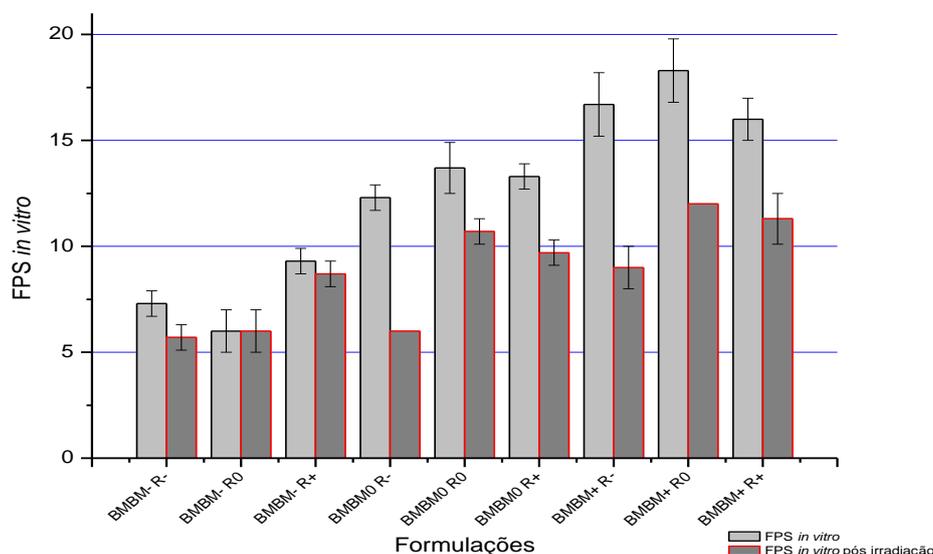
Legenda: BMBM = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; R = rutina; BMBM - = BMBM 0% (p/p); BMBM0 = BMBM 2,5% (p/p); BMBM+ = BMBM 5,0% (p/p); R - = Rutina 0% (p/p); R0 = Rutina 0,1% (p/p) e R+ = Rutina 1,0% (p/p). λ_c = Comprimento De Onda Crítico (média de 3 determinações ± desvio padrão); IRRAD = Irradiação.

Tabela 7. Avaliação da influência da rutina no **razão UVA/UVB** de emulsões fotoprotetoras antes e após irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM e rutina em diferentes níveis de concentração.

IDENTIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	RAZÃO UVA/UVB		MANUTENÇÃO DA RAZÃO UVA/UVB PÓS-IRRAD (%)
	ANTES	PÓS-IRRAD	
BMBM- R-	0,220±0,01	0,199±0,00	90,4±3,5
BMBM- R0	0,277±0,05	0,225±0,02	82,1±7,7
BMBM- R+	0,270±0,01	0,269±0,01	99,7±1,6
BMBM0 R-	0,586±0,01	0,453±0,04	77,3±5,0
BMBM0 R0	0,598±0,01	0,510±0,00	85,4±0,9
BMBM0 R+	0,608±0,00	0,461±0,01	75,9±1,5
BMBM+ R-	0,720±0,01	0,678±0,01	92,8±1,2
BMBM+ R0	0,751±0,01	0,682±0,01	90,9±1,5
BMBM+ R+	0,779±0,01	0,681±0,00	87,5±1,3

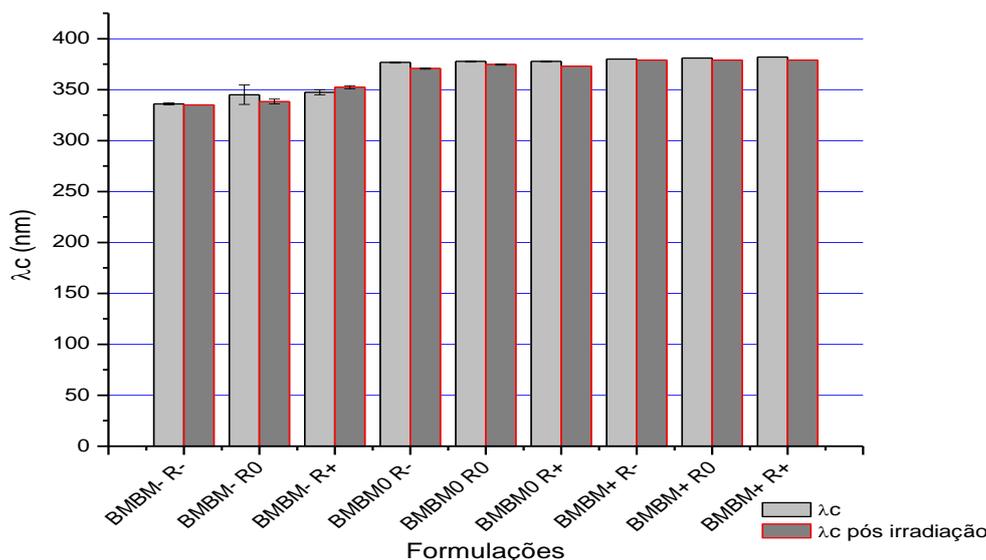
Legenda: BMBM = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; R = rutina; BMBM - = BMBM 0% (p/p); BMBM0 = BMBM 2,5% (p/p); BMBM+ = BMBM 5,0% (p/p); R - = Rutina 0% (p/p); R0 = Rutina 0,1% (p/p) e R+ = Rutina 1,0% (p/p). **Razão UVA/UVB** = Razão Ultra Violeta A/Razão Ultra violeta B (média de 3 determinações ± desvio padrão); IRRAD = Irradiação.

Figura 9. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial $DOE 3^2$ no **FPS *in vitro*** (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC.



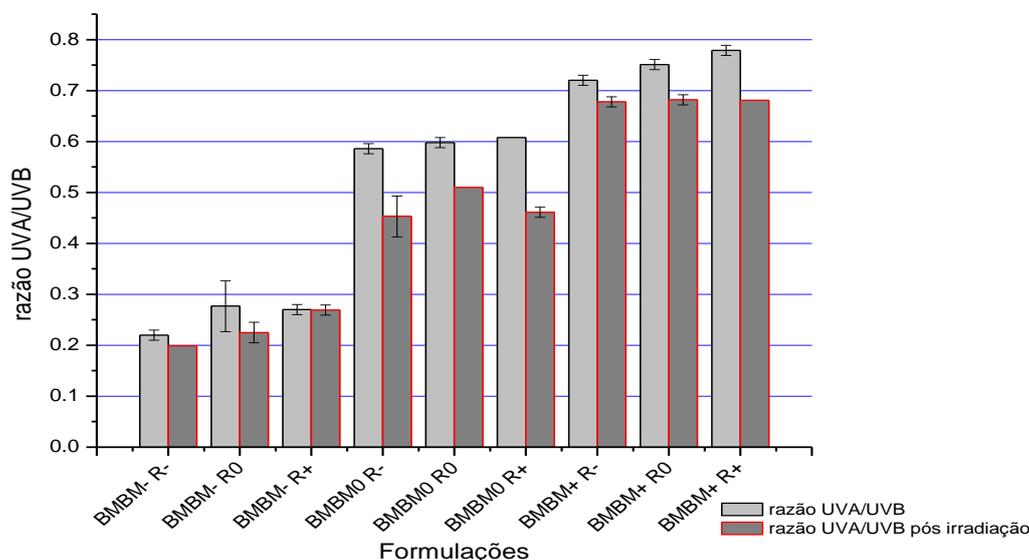
Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM -** = BMBM 0% (p/p); **BMBM0** = BMBM 2,5% (p/p); **BMBM+** = BMBM 5,0% (p/p); **R -** = Rutina 0% (p/p); **R0** = Rutina 0,1% (p/p) e **R+** = Rutina 1,0% (p/p). **FPS *in vitro*** = média de 3 determinações, as barras representam médias de três avaliações \pm desvio padrão.

Figura 10. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial $DOE 3^3$ no λ_c ***in vitro*** (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM -** = BMBM 0% (p/p); **BMBM0** = BMBM 2,5% (p/p); **BMBM+** = BMBM 5,0% (p/p); **R -** = Rutina 0% (p/p); **R0** = Rutina 0,1% (p/p) e **R+** = Rutina 1,0% (p/p). **Comprimento de ond crítico** = média de 3 determinações, as barras representam médias de três avaliações \pm desvio padrão.

Figura 11. Influência da combinação da rutina e do BMBM em diferentes níveis de concentrações de acordo com o planejamento fatorial $DOE 3^3$ na **razão UVA/UVB** (média de três determinações), antes e após a irradiação, de emulsões fotoprotetoras contendo a concentração fixa de 10,0%(p/p) de EHMC.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM -** = BMBM 0% (p/p); **BMBM0** = BMBM 2,5% (p/p); **BMBM+** = BMBM 5,0% (p/p); **R -** = Rutina 0% (p/p); **R0** = Rutina 0,1% (p/p) e **R+** = Rutina 1,0% (p/p). **Razão UVA/UVB** = média de 3 determinações, as barras representam médias de três avaliações \pm desvio padrão.

Por meio da análise dos resultados gerados, de acordo com o planejamento fatorial 3^k , $\alpha=0,05$, verificamos que os resultados do **FPS in vitro** não foi influenciado de forma significativa pela a adição da rutina ($p=0,274$), mas a adição do **BMBM** isolado ($p<0,001$) ou combinado com a rutina ($p=0,003$) influenciou nos valores obtidos. Para as formulações irradiadas, as duas substâncias, isoladas ou combinadas influenciaram nos resultados do **FPS in vitro** ($p<0,001$).

Todas as formulações que continham em sua composição o **BMBM**, nas diferentes combinações e concentrações propostas, antes da irradiação, alcançaram λ_c maior que **370 nm** e se mantiveram acima deste limite após a irradiação. O λ_c corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre 290 e 400 nm. A BMBM é um filtro orgânico dibenzoilmetano que atua na faixa de proteção UVA, com absorção máxima entre 340 e 365 nm (PARIS, *et al.*, 2009; MTURI & MARTINCIGH, 2008). Filtros que atuam na região UVA são reconhecidamente requeridos para obter elevado λ_c . Verificamos que a adição do **BMBM** ($p<0,001$) e da **rutina** ($p=0,018$)

influenciaram no resultado desse parâmetro, mas a combinação das duas substâncias não alterou estatisticamente o λ_c das formulações. Após a irradiação das amostras houve diferença da conservação do λ_c inicial tanto para a adição das substâncias isoladas, **BMBM** ($p=0,025$) e **rutina** ($p=0,046$), quanto para a combinação das duas substâncias combinadas ($p=0,001$).

Dentre as formulações que apresentaram λ_c maior que 370 nm, aquelas que eram compostas pelo **BMBM** na concentração mais elevada (5,0% p/p) (**BMBM+ R-; BMBM+ R0; BMBM+ R+**) resultaram em **FPS *in vitro*** maior ou igual a 15 antes da irradiação UV, sendo que todas elas continham, adicionalmente o **EHMC** (ρ -metoxcinamato de octila) na concentração **10% p/p**. Esse resultado é explicado porque o **FPS *in vitro*** é uma metodologia que avalia a proteção relacionada à radiação UVB, mas considera o espectro UV entre 290 e 400 nm. O filtro **EHMC** pertence ao grupo dos cinamatos e atua na região UVB, com absorção máxima em 310 nm, no entanto, apesar do **BMBM** apresentar absorção máxima na região UVA sua adição colaborou para elevação do valor do FPS em no mínimo 21,5%, comparando-se as formulações sem **BMBM**, (PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001; MAIER *et al.*, 2001).

Após irradiação UV, todas as formulações adicionadas de **BMBM** na menor ou maior concentração (**2,5% e 5,0 p/p**) (**BMBM0 R-; BMBM0 R0; BMBM0 R+; BMBM+ R-; BMBM+ R0; BMBM+ R+**) mantiveram λ_c maior que 370 nm, no entanto nenhuma delas manteve o **FPS *in vitro*** igual ou maior que 15, sendo que as formulações que apresentaram os valores mais elevados para este parâmetro, após a irradiação, foram aquelas adicionadas de **BMBM** na maior concentração e **rutina** (**0,1 e 1,0% p/p**). Os valores obtidos foram $12,0 \pm 0,0$ para **BMBM+ R0** e $11,3 \pm 1,2$ para **BMBM+ R+**.

A adição da **rutina** ($p<0,001$) e do **BMBM** ($p<0,001$), isolados ou **combinados** ($p=0,033$) influenciaram significativamente na porcentagem de **manutenção do FPS *in vitro*** após a irradiação. Dentre as formulações que alcançaram com **FPS *in vitro*** maior que 15 a que não continham a rutina em sua composição apresentaram perda de 46,1% do valor inicial, comportamento semelhante ao relatado na literatura. (SCALIA & MEZZENA, 2010; DONDI, ALBINI & SERPONE, 2006). As formulações adicionadas do filtro **BMBM e**

rutina, além do **EHMC**, conservaram maior **porcentagem do FPS *in vitro*** após irradiação, quando comparadas aos resultados desse parâmetro para as mesmas formulações isentas de rutina, sendo observado incremento entre **11,9 e 16,9** desse valor com a adição da rutina nas concentrações **0,1 e 1,0% (p/p)**, respectivamente.

A elevação da fotoestabilidade pela adição rutina corrobora com o estudo realizado por Scalia & Mezzena (2011) que avaliaram o efeito na fotoestabilização de fotoprotetores compostos pela combinação BMBM (3,0% p/p) e EHMC (4,0% p/p) ocasionados pela adição da quercetina, que também pertence a família dos flavonoides, em três concentrações diferentes (0,25; 0,5 e 1,0% p/p). No estudo realizado por Scalia & Mezzena a elevação máxima da preservação do filtro BMBM após irradiação de 9,0% e para EMHC foi de 12,0%, esses valores foram obtidos na concentração de 0,5% p/p de quercetina.

O emprego de flavonoides na fotoestabilização de filtros solares é promissor, mas ainda não foi elucidado o mecanismo pelo qual ocorre sua atuação. O efeito de fotoestabilização não é atribuído somente pela atividade antioxidante e eficiente quelação de íons metálicos, mas também, por fatores adicionais que incluem sua possível habilidade em promover o retorno da molécula do filtro solar ao estado energético fundamental (SCALIA & MEZZENA, 2011).

A razão **UVA/UVB**, antes da irradiação, foi influenciada pela adição do **BMBM ($p < 0,001$)** e da **rutina ($p = 0,001$)** isolados, mas não pela combinação das duas substâncias (**$p = 0,226$**). Após a irradiação tanto as substâncias isoladas **BMBM ($p < 0,001$)** e **rutina ($p = 0,001$)** quanto combinadas (**$p < 0,001$**) influenciaram nesse resultado. Este comportamento já era esperado, uma vez que a razão UVA/UVB é muito influenciada pela presença de filtros que atuam na região UVA e a diminuição daqueles que atuam na região UVB (UNITED STATES, 2011). A adição do **BMBM** influenciou fortemente para elevação deste parâmetro. Em estudo realizado por Velasco e colaboradores (2008) foram avaliadas formulações adicionadas de diferentes combinações dos filtros EHMC, BENZOPHENONE-3 e rutina. A formulação base apresentou razão

UVA/UVB; 0,77; enquanto que aquelas compostas das diferentes combinações dos filtros, adicionadas ou não de rutina, apresentaram valores inferiores a 0,5. De acordo com o FDA, 2011, este parâmetro deve ser considerado com cautela, pois pode apresentar resultados que não traduzem a eficácia protetora, sendo que a diminuição da concentração do princípio ativo responsável pela fotoproteção na região UVB pode elevar o valor da razão, sem representar maior proteção UVA. (UNITED STATES, 2011; VELASCO *et. al.*, 2008).

Após avaliação dos resultados do planejamento estatístico 3^k as formulações foram agrupadas em três grupos baseados na concentração do **BMBM**, como segue: grupo sem adição do BMBM (**BMBM-**); grupo com adição de 2,5% (p/p) do BMBM (**BMBM0**) e grupo com adição de 5,0% (p/p) do BMBM (**BMBM+**). Cada grupo descrito apresentava variações da concentração de rutina (**0,0; 0,1 e 1,0% p/p**). Finalmente, procedeu-se a análise estatística de cada grupo separadamente. Após o teste de normalidade e homogeneidade, foi aplicada a análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O resultado obtido está expresso na **Tabela 8**.

Baseada nos resultados apresentados na **Tabela 8**, a análise estatística do grupo sem adição de BMBM (**BMBM-**) demonstrou que antes da irradiação somente os resultados de FPS *in vitro* apresentaram diferenças estatisticamente significativas, sendo as formulações sem rutina (**BMBM-R-**) e com rutina a 0,1% (p/p) (**BMBM-R0**) apresentaram valores que não foram considerados diferentes estatisticamente. A adição da rutina a 1,0% (p/p) (**BMBM-R+**) proporcionou resultado estatisticamente diferente das outras duas formulações, adicionada de rutina a 0,1% p/p (**BMBM-R0**) e sem adição de rutina (**BMBM-R+**). Após a irradiação, os resultados da porcentagem da manutenção dos parâmetros de FPS *in vitro*; λ_c e razão UVA/UVB apresentaram comportamento diferenciado entre as formulações com adição de rutina. A porcentagem de manutenção do FPS *in vitro* da formulação não adicionada de rutina (**BMBM-R-**) foi diferente em relação as formulações que continham a rutina nas duas concentrações (**0,1 e 1,0% p/p**) (**BMBM-R0 e BMBM-R+**). Estas apresentaram comportamento similar em relação a

manutenção dos parâmetros λ_c e razão **UVA/UVB**, após a irradiação, sendo que a adição da rutina a **0,1% e 1,0% (p/p) (BMBM-R0 e BMBM-R+)** promoveu resultados considerados, estatisticamente, análogos aos obtidos para a formulação sem rutina, mas diferentes entre si. Os resultados do grupo de formulações não adicionado de **BMBM** proporcionou informações valiosas sobre a interação da rutina com o **EHMC**, demonstrando resultados positivos com elevação dos parâmetros observados.

A análise do grupo com a adição do **BMBM** na concentração intermediária, **BMBM0 (2,5% p/p)** demonstrou que somente após a irradiação a adição da rutina modificou significativamente os resultados obtidos para todos os parâmetros avaliados. A adição da rutina provocou elevação na manutenção do **FPS *in vitro***, após a irradiação, sendo que nas concentrações **0,1 e 1,0% (p/p) (BMBM0R0 e BMBM0R+)** os resultados foram considerados estatisticamente diferentes daqueles obtidos para a formulação sem rutina (**BMBM0R-**). A manutenção do λ_c também apresentou resultados diferentes após a irradiação considerando-se a adição da rutina. Neste caso, a formulação sem adição da rutina (**BMBM0R-**) e a com adição de rutina a **1,0% (p/p) (BMBM0R+)** apresentaram valores estatisticamente similares entre si e diferentes daqueles obtidos para a formulação adicionada de **0,1% de rutina (BMBM0R0)**.

A comparação entre o grupo com a concentração máxima de **BMBM (5,0% p/p) BMBM+**, revelou que, somente para o **FPS *in vitro*** inicial não foram obtidos resultados com diferença significativa para a adição da rutina. Para todos os outros parâmetros avaliados os resultados foram considerados estatisticamente diferentes, denotando influência da adição da rutina. A porcentagem de manutenção do **FPS *in vitro***, após irradiação, apresentou diferenças significativas entre a formulação não adicionada de rutina (**BMBM+R-**) e aquelas adicionadas de rutina nas duas concentrações (**0,1 e 1,0% p/p) (BMBM+R0 e BMBM+R+)**. Para os parâmetro λ_c e **razão UVA/UVB** foi possível observar que a adição da rutina gerou diferenças significativas entre as formulações, tanto antes quanto depois da irradiação, sendo todas consideradas diferentes entre si. Para estes parâmetros foi possível observar uma

discreta tendência na elevação do valor não irradiado com a elevação da concentração da rutina, comportamento inverso ao da manutenção desses mesmos parâmetros após a irradiação.

Concluindo, as principais observações dessa análise foram que a adição da rutina propiciou diferenças estatisticamente significativas no **FPS *in vitro***, antes da irradiação, somente para a formulação não adicionada de **BMBM**. Após a irradiação das amostras, todos os grupos, (**BMBM-**; **BMBM0**; **BMBM+**) apresentaram elevação da manutenção do **FPS *in vitro*** com a adição da rutina e os resultados foram considerados estatisticamente diferentes, **Tabela 8**. O λ_c e **razão UVA/UVB** apresentaram elevação estatisticamente significativa com a adição da rutina, antes da irradiação, somente para o grupo **BMBM+**.

Tabela 8. Avaliação eficácia fotoprotetora *in vitro* de emulsões antes e após a irradiação UV. Componentes ativos: EHMC na concentração fixa de 10% p/p combinado com o BMBM na concentração intermediária e máxima e rutina nos 3 níveis de concentração propostos.

IDENTIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	FPS <i>in vitro</i>		λ_c		Razão UVA/UVB	
	NÃO IRRAD	(%)PÓS-IRRAD	NÃO IRRAD	(%)PÓS-IRRAD	NÃO IRRAD	(%)PÓS-IRRAD
BMBM- R-	7,3 ±0,6 ^b	77,4±7,4 ^b	336,0±1,0 ^a	99,7±0,3 ^{ab}	0,220±0,01 ^a	90,4±3,5 ^{ab}
BMBM- R0	6,0±1,0 ^b	100,00±0,0 ^a	345,0±9,5 ^a	98,1±2,0 ^b	0,277±0,05 ^a	82,1±7,7 ^b
BMBM- R+	9,3±0,6 ^a	93,0±6,1 ^a	347,3±2,5 ^a	101,4±0,3 ^a	0,270±0,01 ^a	99,7±1,6 ^a
<i>p</i> (Teste de Tukey)	0,004	0,004	0,109	0,038	0,112	0,04
BMBM0 R-	12,3±0,6 ^a	48,7±2,2 ^b	376,7±0,6 ^a	98,4±0,0 ^b	0,586±0,01 ^a	77,3±5,0 ^a
BMBM0 R0	13,7±1,2 ^a	78,3±5,8 ^a	377,7±0,6 ^a	99,2±0,3 ^a	0,598±0,01 ^a	85,4±0,9 ^a
BMBM0 R+	13,3±0,6 ^a	72,5±4,0 ^a	377,7±0,6 ^a	98,8±0,2 ^b	0,608±0,00 ^a	75,9±1,5 ^a
<i>p</i> (Teste de Tukey)	0,196	<0,001	0,125	0,004	0,252	0,974
BMBM+ R-	16,7±1,5 ^a	53,9±1,4 ^b	380,0±0,0 ^c	99,7±0,0 ^a	0,720±0,01 ^b	92,8±1,2 ^a
BMBM+ R0	18,3±1,5 ^a	65,8±5,4 ^a	381,0±0,0 ^b	99,5±0,0 ^b	0,751±0,01 ^b	90,9±1,5 ^a
BMBM+ R+	16,0±1,0 ^a	70,8±4,2 ^a	382,0±0,0 ^a	99,2±0,0 ^c	0,779±0,01 ^a	87,5±1,3 ^b
<i>p</i> (Teste de Tukey)	0,182	0,006	<0,001	<0,001	0,002	0,007

Legenda: BMBM = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; R = rutina; BMBM0 = BMBM 2,5% (p/p); BMBM+ = BMBM 5,0% (p/p); R - = Rutina 0% (p/p); R0 = Rutina 0,1% (p/p) e R+ = Rutina 1,0% (p/p). Média de 3 determinações ± desvio padrão; FPS = Fator de Proteção; λ_c = Comprimento de Onda crítico; razão UVA/UVB = razão Ultra Violeta A e B. IRRAD = Irradiação. Letras diferentes sobrescritas numa mesma coluna, para cada grupo, representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Considerando as análise do planejamento fatorial 3^k e a avaliação estatística dos três grupos baseados na concentração do **BMBM**, adicionalmente levando em conta o conceito de amplo espectro de fotoproteção as formulações **BMBM+R0** e **BMBM+R+** foram selecionadas para serem submetidas à *Avaliação da Estabilidade Preliminar*.

5.2.1 AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE – RADIAÇÃO SOLAR NATURAL

A partir dos resultados obtidos na avaliação da influência da adição rotina na fotoestabilização de formulações fotoprotetoras contendo **BMBM** e **EHMC**, procedeu-se a avaliação das formulações **BMBM+R0**; **BMBM+R+** sob exposição à radiação solar natural. Adicionalmente, para efeito de comparação, foram avaliadas as formulações **BMBM+R-** e outra contendo a mesma proporção dos filtros BMBM e EHMC (5,0 E 10,0% p/p, respectivamente) adicionada do filtro fotoestabilizador BEMT, BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, na concentração de 5,0% (p/p). As amostras foram avaliadas antes da exposição a radiação e a cada 10 min, durante 40 min. A irradiância média do dia foi de 140 a 160 W m⁻² e o IUV registrado para o horário da exposição foi 7.

A variação dos resultados para os parâmetros λ_c e razão UVA/UVB não excederam 12,0% para todas as formulações, sendo concordante com os valores obtidos para a irradiação artificial das amostras.

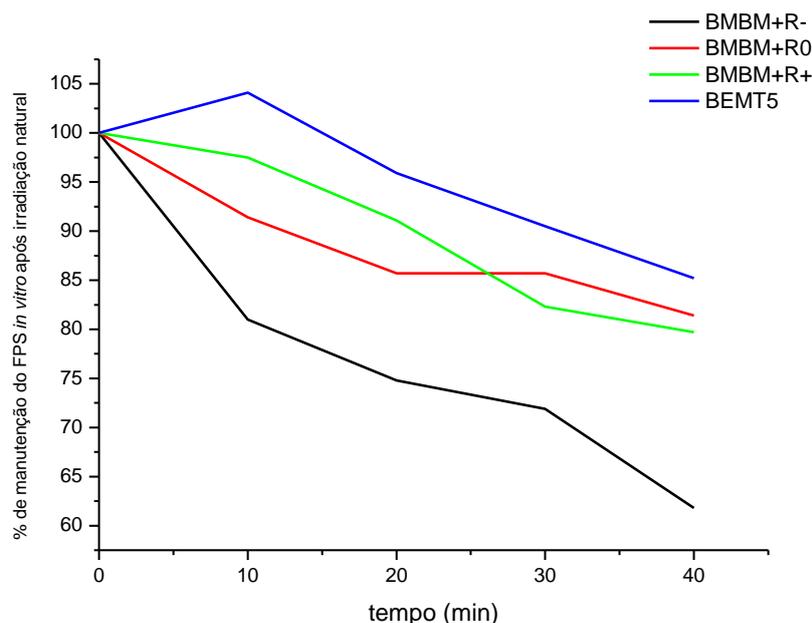
Os resultados obtidos para a avaliação do **FPS *in vitro*** são apresentados na **Tabela 9 e Figura 12** como a variação percentual do valor inicial. Procedeu-se a análise estatística do valor final d manutenção do **FPS *in vitro***. Após o teste de normalidade e homogeneidade, foi aplicada a análise de variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

Tabela 9. Manutenção do FPS *in vitro* após exposição à radiação natural das formulações **BMBM+R-**; **BMBM+R0**; **BMBM+R+** e **BEMT5**.

Tempo (min)	% de manutenção do FPS <i>in vitro</i>			
	BMBM+R-	BMBM+R0	BMBM+R+	BEMT5
10	81,0±4,1	91,4±0,4	97,5±2,3	104,1±5,2
20	74,8±1,8	85,7±7,5	91,1±0,2	95,9±5,2
30	71,9±2,6	85,7±7,5	82,3±0,4	90,5±0,5
40	61,8±4,1 ^b	81,4±7,7 ^a	79,7±1,9 ^a	85,2±4,3 ^a

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** = BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **BEMT5** = BEMT 5,0% (p/p), **R** = rutina; **R-** = 0,0% (p/p); **R0** = 0,1% (p/p); **R+** = rutina 1,0% (p/p). Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p=0,002).

Figura 12. Avaliação da manutenção do FPS *in vitro* para as formulações **BMBM+R-**; **BMBM+R0**; **BMBM+R+** e **BEMT5** expostas a radiação solar natural.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** = BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **BEMT5** = BEMT 5,0% (p/p), **R** = rutina; **R-** = 0,0% (p/p); **R0** = 0,1% (p/p); **R+** = rutina 1,0% (p/p). **min** = minutos Os resultados são expressos como média de 3 determinações.

A avaliação do perfil de manutenção do FPS *in vitro*, sob exposição à radiação natural forneceu informações relevantes sobre a fotoestabilidade das formulações avaliadas. Ao final de 40 min de exposição foi possível notar que

as formulações adicionadas do fotoestabilizador **BEMT** e da **rutina (BEMT5; BMBM+R0 e BMBM+R+)** apresentaram tendência de manutenção do **FPS in vitro** mais elevada comparadas àquela que não continha o flavonoide e o fotoestabilizador (**BMBM+R-**). Os resultados finais em termos de % de conservação do FPS *in vitro* se assemelhou aos obtidos sob radiação artificial, nas condições empregadas neste estudo, dose de 192 kJ m⁻², irradiância 209,2 W m⁻², faixa de 300 e 800 nm, padronizada por radiômetro, a temperatura foi mantida a 37 ± 2,0 °C.

Na **Tabela 10** apresentamos os resultados para a manutenção da do FPS *in vitro* obtidos pela exposição a radiação artificial (15 min) e natural (40 min).

Tabela 10. Resultados da manutenção do FPS *in vitro* para as formulações **BMBM+R-**; **BMBM+R0**; **BMBM+R+** e **BEMT5**.

Formulação	Manutenção do FPS <i>in vitro</i> de acordo com a condição de exposição a radiação UV	
	Artificial (15 minutos)	Natural (40 minutos)
BMBM+R-	53,9±1,4 ^b	61,8±4,1 ^b
BMBM+R0	65,8±5,4 ^a	81,4±7,7 ^a
BMBM+R+	70,8±4,2 ^a	79,7±1,9 ^a
BEMT5	69,8±2,8 ^a	85,2±4,3 ^a

Legenda: **BMBM** - BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **EHMC** - ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE; **BEMT-** BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, **BMBM + =** BMBM 5,0% (p/p); **BEMT5** = BEMT 5,0% (p/p), **R** = rutina; **R-** = 0,0% (p/p); **R0** = 0,1% (p/p); **R+** = rutina1,0% (p/p). Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas, na mesma coluna representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Como observado por Gonzalez, Pechko & Kalafsky (2007) a irradiação natural comparada a artificial apresentou resultados qualitativos finais similares, apesar da diferença do tempo de exposição, 15 min para exposição à radiação artificial e 40 min para a natural. Nas duas condições, as formulações adicionadas de **rutina (BMBM+R0; BMBM+R+)** ou do fotoestabilizador **BEMT (BEMT5)** proporcionaram elevação da manutenção do FPS *in vitro* após a

irradiação, comparadas com aquela que não continha o fotoestabilizador **BEMT** ou a **rutina (BMBM+R-)** (GONZALEZ, PECHKO & KALAFSKY, 2007).

A radiação solar recebida na superfície terrestre inclui: ondas de rádio, micro-ondas, radiação infra-vermelha, luz visível, raios X, radiação γ e UV (A e B). O recurso que caracteriza as propriedades de qualquer região específica do espectro é o comprimento de onda. Nesse sentido a radiação UV é subdividida em UVB ($\lambda > 290$ e < 320 nm); UVA II ($\lambda > 320$ e < 340 nm) e UVA I ($\lambda > 340$ e < 400 nm). Essa divisão é arbitrária e os seres humanos são expostos ao espectro total que atinge o planeta (NASH, TANNER & MATTS, 2006; DIFFEY, 2002).

Fontes artificiais de radiação UV emitem um espectro específico para cada fonte de acordo com as lâmpadas utilizadas. Os estudos sobre fotoestabilidade de filtros solares envolvem parâmetros de exposição como a irradiância, dose e faixa espectral. Além disso, a terminologia utilizada para identificar as quantidades aplicadas se apresenta de forma variada, dificultando ainda mais a comparação dos resultados. O tempo integral de irradiância é denominado, segundo Diffey (2002) como exposição radiante, mas muitas vezes é expressada como dose de exposição ou simplesmente dose. As unidades utilizadas variam, como por exemplo mJ cm^{-2} ou kJ m^{-2} (DIFFEY, 2002).

Em alguns trabalhos sobre fotoestabilidade de filtros solares encontramos o termo MED (*Minimal Erythema Dose*) como referência a dose aplicada, esse termo deveria ser reservado para experimentos com humanos ou animais por se tratar de uma variável da sensibilidade natural de cada indivíduo a radiação UV. Já o termo SED (Standard Erythema Dose) é considerado adequado para se referir a exposição radiante efetiva eritemica. Um SED equivale a uma exposição radiante efetiva eritemica de 100 Jm^{-2} (DIFFEY, 2002).

O problema de dosimetria para estudar a estabilidade dos filtros solares é que a habilidade da radiação UV em provocar alterações na capacidade de

absorção de radiação depende fortemente da faixa de comprimento de onda aplicada (DIFFEY, 2002; NASH, TANNER & MATTS, 2006).

Esse fato foi ilustrado por NASH, TANNER & MATTS, 2006, ao submeterem o BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, veiculado em uma emulsão à exposição de uma dose de 30 J m^{-2} , aplicada em faixas espectrais diferentes. A amostra submetida a faixa espectral entre 290 e 400 nm apresentou perfil de absorção bem mais alterado do que aquela submetida somente a faixa de 320 a 400 nm (região UVA). Apesar da radiação UVB colaborar com apenas 6,0% da radiação UV incidente na Terra, eliminar esta parte do espectro alterou drasticamente o resultado do estudo NASH, TANNER & MATTS, 2006).

Pelo exposto, podemos inferir que as condições adotadas em nosso trabalho para a irradiação artificial das amostras foi adequada e gerou resultados qualitativos comparáveis aos da irradiação natural.

5.3 TESTE DA ESTABILIDADE ACELERADA

As condições extremas do *Teste de Estabilidade Acelerada*, como a variação da temperatura de armazenamento, ciclos de congelamento e descongelamento e exposição à radiação podem acelerar possíveis reações entre os componentes das formulações estudadas e fornecer informações preditivas que indiquem seu grau de estabilidade (BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Diferentes aspectos podem ser avaliados durante o *Teste de Estabilidade Acelerada* como: químico (teor do princípio ativo e possíveis produtos de degradação); físico (aparência, cor, odor e viscosidade); microbiológico (teste de eficácia para conservante) e funcional, que pode variar de acordo com a finalidade do produto (MORAES, 2012; BABY, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

O objetivo nessa etapa do trabalho foi verificar se as temperaturas baixas e elevadas selecionadas para estudo resultariam na aceleração da

degradação das formulações e, sob essas condições, estudar a influência da adição de fotoestabilizadores como o BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE BEMT e a rutina na estabilidade física, físico-química, química e funcional dos fotoprotetores desenvolvidos (NISHIKAWA *et al*, 2013; MORAES, 2012; BABY, 2007. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As preparações selecionadas a partir dos dados obtidos na avaliação da influência da rutina na fotoestabilização de formulação fotoprotetora contendo o BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE foram preparadas como descrito em 4.2.1.1 e submetidas às condições de armazenamento selecionadas para este estudo, temperaturas: elevada (**$45,0 \pm 2,0$ °C**);baixa (**$5,0 \pm 2,0$ °C**) e ambiente (**$20,0 \pm 5,0$ °C**) com exposição a radiação solar direta e indireta, por um período de 15 dias. Além disso, as formulações também foram submetidas a ciclos de **24 horas a 45 ± 2 °C e 24 horas a $- 5 \pm 2$ °C**, durante o período de 12 dias (6 ciclos) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

As amostras foram avaliadas quanto a variação da homogeneidade, cor, valores de pH e parâmetros funcionais (FPS *in vitro*, λ_c , razão UVA/UVB e atividade antirradicalar). Adicionalmente, os filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** foram quantificados por qRMN, pelo método validado no Capítulo 1 deste trabalho.

Todas as avaliações foram realizadas, inicialmente, 48 horas após o preparo das emulsões, considerado como tempo zero (t_0), e ao final do tempo estabelecido para cada condição adotada para o estudo (t_{final}).

Nas **Tabelas 11, 12, 13 e 14** são apresentados os resultados da caracterização inicial e avaliação final das formulações submetidas ao *Teste de Estabilidade Acelerada*.

Tabela 11. Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção *in vitro*) e quantificação dos filtros **BMBM** e **EHMC** no início e ao final da *Teste de Estabilidade Acelerada*– formulação **BMBM+ R-**.

Parâmetro avaliado		Formulação BMBM+ R-				
		t ₀	t _{final} – condição de exposição			
			Ciclo	5,0 ± 2,0 °C	45,0 ± 2,0 °C	20,0 ± 5,0 °C
FPS <i>in vitro</i>	Não Irradiada	16,7±1,5 ^a	20,7±1,2 ^a	21,0±3,0 ^a	23,3±4,7 ^a	21,0±2,6 ^a
	% manutenção do FPS após irradiação	53,9±1,4 ^a	53,2±2,8 ^a	54,0±1,6 ^a	53,2±2,1 ^a	53,9±1,2 ^a
λ _c	Não Irradiada	380,0±0,0	381,0±0,0	379,7±0,6	380,7±0,6	380±0,0
	% manutenção do λ _c após irradiação	99,7±0,0	99,3±0,2	99,6±0,2	99,6±0,2	99,7±0,0
Razão UVA/UVB	Não Irradiada	0,730±0,01	0,731±0,01	0,726±0,01	0,744±0,01	0,722±0,01
	% manutenção da razão UVA/UVB após irradiação	92,8±1,2	90,1±1,8	90,8±2,8	90,1±2,1	91,1±2,1
Concentração dos filtros (%p/p)	BMBM	5,3±0,3 ^a	5,1±0,1 ^a	5,1±0,2 ^a	5,1±0,2 ^a	5,3±0,3 ^a
	EHMC	9,7±0,1 ^a	9,7,0±0,2 ^a	10,5±0,5 ^a	10,1±0,3 ^a	10,0±0,3 ^a
Atividade antioxidante (% de inibição do radical DPPH*)		7,8±1,0	10,0±0,8	7,8±1,0	12,2±0,6	11,1±0,4
Valor de pH		6,4±0,0	6,3±0,0	6,3±0,0	6,3±0,0	6,3±0,0
Homogeneidade		N	N	N	LM	LM
Cor		Branca	N	N	N	N

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **R-** = isenta de rutina; t₀ = 48 horas após o preparo das formulações; t_{final} = 12 dias para a condição ciclo e 15 dias para as demais condições; λ_c = Comprimento de Onda Crítico. Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas, na mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). **N** – Normal, sem alterações (homogêneo); **LM** – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases)

Tabela 12. Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção *in vitro*) e quantificação dos filtros **BMBM** e **EHMC** no início e ao final da *Teste de Estabilidade Acelerada* – formulação **BMBM+R0**.

Parâmetro avaliado		Formulação BMBM+ R0				
		t ₀	t _{final} – condição de exposição			
			Ciclo	5 ± 2 °C	45 ± 2 °C	20 ± 10 °C
FPS <i>in vitro</i>	Não Irradiada	19,0±1,0 ^a	22,0±1,0 ^a	19,7±1,5 ^a	20,0±1,7 ^a	20,3±1,2 ^a
	% manutenção do FPS após irradiação	66,6±1,9 ^a	65,3±5,5 ^a	67,8±1,9 ^a	63,2±3,1 ^a	65,5±2,0 ^a
λ _c	Não Irradiada	381,0±0,0	380,0±0,0	380,7±0,6	380,0±0,0	380,0±0,0
	% manutenção do λ _c após irradiação	99,5±0,0	99,7±0,0	99,6±0,1	99,5±0,0	99,5±0,0
Razão UVA/UVB	Não Irradiada	0,751±0,01	0,741±0,01	0,739±0,01	0,725±0,01	0,725±0,01
	% manutenção da razão UVA/UVB após irradiação	90,9±1,5	90,1±1,2	92,6±1,8	91,3±2,6	91,3±2,6
Concentração dos filtros (%p/p)	BMBM	4,9±0,2 ^a	4,8±0,2 ^a	5,2±0,3 ^a	5,2±0,2 ^a	4,9±0,2 ^a
	EHMC	9,8±0,4 ^a	9,6±0,4 ^a	10,4±0,6 ^a	10,4±0,5 ^a	9,6±0,4 ^a
Atividade antioxidante (% de inibição do radical DPPH*)		68,7,5±1,5	77,8±0,9	78,8±3,1	75,8±1,7	74,2±4,9
Valor de pH		7,0±0,0	7,0±0,0	6,9±0,0	6,9±0,0	7,0±0,0 ^a
Homogeneidade		N	N	N	LM	LM
Cor		Amarelo claro	N	N	N	N

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **R0** = rutina na concentração 0,1% (p/p); t₀ = 48 horas após o preparo das formulações; t_{final} = 12 dias para a condição ciclo e 15 dias para as demais condições; λ_c = Comprimento de Onda Crítico. Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas, na mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). **N** – Normal, sem alterações (homogêneo); **LM** – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases)

Tabela 13. Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção *in vitro*) e quantificação dos filtros **BMBM** e **EHMC** no início e ao final da *Teste de Estabilidade Acelerada* – formulação **BMBM+R+**.

Parâmetro avaliado		Formulação BMBM+ R+				
		t ₀	t _{final} – condição de exposição			
			Ciclo	5 ± 2 °C	45 ± 2 °C	20 ± 10 °C
FPS <i>in vitro</i>	Não Irradiada	18,3±3,2 ^a	17,7±0,6 ^a	17,0±1,0 ^a	15,7±0,6 ^a	15,7±0,6 ^a
	% manutenção do FPS após irradiação	74,7±1,9 ^a	75,5±2,9 ^a	72,5±3,9 ^a	78,8±3,3 ^a	71,8±1,4 ^a
λ _c	Não Irradiada	382,0±0,0	382,0±0,0	382,0±0,0	382,7±0,6	381,0±0,0
	% manutenção do λ _c após irradiação	99,2±0,0	99,4±0,2 ^a	99,4±0,2	99,1±0,1	99,5±0,0
Razão UVA/UVB	Não Irradiada	0,779±0,01	0,777±0,01	0,783±0,01	0,805±0,01	0,762±0,01
	% manutenção da razão UVA/UVB após irradiação	87,5±1,3	90,1±1,0	89,0±1,6	86,1±1,1	88,9±1,7
Concentração dos filtros (%p/p)	BMBM	5,0±0,2 ^a	4,9±0,3 ^a	4,9±0,1 ^a	4,8±0,1 ^a	4,9±0,5 ^a
	EHMC	9,8,±0,1 ^a	9,7±0,2 ^a	9,8±0,1 ^a	10,2±0,3 ^a	10,0±0,3 ^a
Atividade antioxidante (% de inibição do radical DPPH*)		92,9±0,2	91,4±0,2	91,7±0,1	90,6±0,3	91,6±0,3
Valor de pH		6,5±0,0	6,4±0,0	6,4±0,0	6,4±0,0	6,3±0,0
Homogeneidade		N	N	N	LM	LM
Cor		Amarelo	N	N	N	N

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **R** = rutina; **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **R+** = rutina 1,0%; (P/P); t₀ = 48 horas após o preparo das formulações; t_{final} = 12 dias para a condição ciclo e 15 dias para as demais condições; λ_c – Comprimento de Onda Crítico. Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas, na mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). **N** – Normal, sem alterações (homogêneo); **LM** – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases)

Tabela 14. Caracterização físico-química, funcional (fotoproteção *in vitro*) e quantificação dos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** no início e ao final do *Teste de Estabilidade Acelerada* – formulação **BEMT5**.

Parâmetro avaliado		Formulação BEMT5				
		t ₀	t _{final} – condição de exposição			
			Ciclo	5 ± 2 °C	45 ± 2 °C	20 ± 10 °C
FPS <i>in vitro</i>	Não Irradiada	18,7±2,9 ^a	21,0±1,7 ^a	20,0±3,0 ^a	18,7±1,2 ^a	18,7±2,1 ^a
	% manutenção do FPS após irradiação	69,8±2,8 ^a	66,7±2,8 ^a	71,3±4,2 ^a	71,5±2,1 ^a	70,2±6,5 ^a
λ _c	Não Irradiada	381,0±0,0	381,0±0,0	381,3±0,6	382,0±0,0	380,3±0,6
	% manutenção do λ _c após irradiação	99,5±0,0	99,5±0,0	99,6±0,1	99,5±0,0	99,8±0,2
Razão UVA/UVB	Não Irradiada	0,803±0,01	0,801±0,01	0,813±0,00	0,837±0,00	0,799±0,02
	% manutenção da razão UVA/UVB após irradiação	92,87±1,4	93,7±2,0	93,9±0,7	92,4±0,2	95,7±1,2
Concentração dos filtros (%p/p)	BMBM	5,0±0,2 ^a	4,8±0,2 ^a	4,8±0,5 ^a	4,9±0,1 ^a	4,7±0,3 ^a
	BEMT	4,7±0,2 ^a	4,7±0,1 ^a	4,6±0,5 ^a	4,7±0,1 ^a	4,5±0,3 ^a
	EHMC	10,2±0,4 ^a	9,7±0,2 ^a	9,4±1,0 ^a	9,8±0,2 ^a	9,3±0,8 ^a
Atividade antioxidante (% de inibição do radical DPPH*)		11,9±0,7	10,5±1,2	11,9±0,7	12,6±0,6	13,6±0,3
Valor de pH		6,2±0,0	6,2±0,0	6,2±0,0	6,2±0,0	6,3±0,0
Homogeneidade		N	N	N	LM	LM
Cor		Amarelo	N	N	N	N

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **BEMT** = BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, **BMBM +** = BMBM 5,0% (p/p); **BEMT5** = BEMT 5,0% (p/p); t₀ = 48 horas após o preparo das formulações; t_{final} = 12 dias para a condição ciclo e 15 dias para as demais condições; λ_c = Comprimento de Onda Crítico. Os resultados são expressos como média de 3 determinações ± desvio padrão. Letras diferentes sobrescritas, na mesma linha representam dados diferentes estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). **N** – Normal, sem alterações (homogêneo); **LM** – Levemente Modificado (início de alterações como a separação de fases)

As informações obtidas nos Estudos de Estabilidade são particularmente importantes para os veículos emulsionados, pois podem fornecer sinais de desestabilização importantes como: cremeação, sedimentação, flocculação, coalescência e, por fim, separação de fases e inativação de substâncias ativas (BABY, 2007; WASHINGTON, 1996; IDSON, 1988). A *Avaliação da Estabilidade Preliminar* não tem o objetivo de estimar a vida útil do produto, mas sim auxiliar na triagem das formulações, pois adota condições extremas de armazenamento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). Nesse estudo as condições extremas aplicadas promoveram leves alterações que forneceram informações adicionais sobre as formulações estudadas.

As características de homogeneidade foram mantidas para todas as formulações sem alterações perceptíveis, exceto para as amostras que foram mantidas nas condições **45,0 ± 2,0 °C e ambiente com luz solar direta e indireta**, sendo que em todas elas apresentaram leves sinais de início de separação de fases. Essas condições de armazenamento são consideradas extremas e na literatura frequentemente são relatadas alterações das emulsões provocadas por elas (MORAES, 2012; BABY 2007, PINTO, 2004)

A coloração diferenciada, apresentada inicialmente, foi mantida até o final do estudo, branca para formulação **BMBM+R-**, amarelo claro para a formulação **BMBM+R0** e amarelo para as formulações **BMBM+R+** e **BEMT5**, de acordo com a adição das substâncias fotoestabilizadoras propostas. A rutina tem cor amarelada e transferiu essa característica para as formulações, sendo que a diferença na concentração utilizada alterou a cor final do produto. Na menor concentração (0,1% p/p) (**BMBM+R0**) a cor apresentada foi amarelo claro e na maior concentração (1,0% p/p) (**BMBM+R+**), a cor gerada foi amarelo. A formulação isenta de rutina e adicionada do fotoestabilizador **BEMT** a 5% (p/p) (**BEMT5**), também, apresentou a cor amarela. Alterações da cor podem evidenciar processos de degradação como oxidação ou complexação de substâncias como observado em estudos de estabilidade de emulsões contendo flavonoides. Em geral, temperaturas elevadas tendem a provocar o

escurecimento dessas formulações em tempos mais reduzidos quando comparadas a exposição em valores menores e este comportamento indicou que em temperaturas elevadas a velocidade de degradação aumentou.

Nishikawa e colaboradores (2013) avaliaram a estabilidade de fotoprotetores contendo filtros inorgânicos e quercetina. Neste estudo a formulação adicionada do flavonoide, e dos filtros físicos dióxido de titânio e óxido de zinco, apresentaram intensa variação de cor que sugeriu ocorrer interação dos filtros físicos com a quercetina em todas as condições de armazenamento do estudo a partir do 30º dia de análise. Esta variação prejudicou a avaliação do perfil fotoprotetor da formulação. Alterações de cor também foram observadas em formulações contendo *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham naquelas armazenadas na temperatura de $40,0 \pm 0,5$ °C ao final do período de 90 dias, em um estudo conduzido por Baby e colaboradores (2007). Moraes (2012) avaliou formulações fotoprotetoras adicionadas de succinato de rutina e também observou alterações na cor das formulações na temperatura mais elevada, $45,0 \pm 0,5$ °C e, também, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), aos 60 dias do estudo. Estes trabalhos utilizaram emulsões com composições diferenciadas, mas todos tinham em comum a adição de algum flavonoide e todas apresentaram alteração da cor. Em nosso trabalho não observamos este perfil, provavelmente porque o tempo de análise foi reduzido e não foi suficiente para provocar esse tipo de modificação.

Todas as análises quantitativas foram avaliadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA one-way), seguida pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), após o teste de normalidade e análise de homogeneidade das amostras pelo programa Minitab 1.6.

O valor de **pH** inicial de todas as formulações avaliadas foi de $6,5 \pm 0,3$ e se manteve durante o estudo com pequenas variações, sendo que a maior alteração ocorreu na formulação **BMBM+R+**, 3,0%, na condição $45,0 \pm 2,0$ °C, que passou de **6,5** para **6,3**. **Tabela 13**. Apesar das alterações, os valores de pH mantiveram-se compatíveis com o valor de pH fisiológico (6,0 a 7,2) (BABY,

2007). Trabalhos que avaliaram a estabilidade de formulações contendo flavonoides também observaram estabilidade do valor de pH, com variações abaixo de 15,0% para estudos com até 120 dias de duração (NISHIKAWA *et al.*, 2013; MORAES, 2012; BABY *et al.*, 2007). Variações nos valores de pH podem indicar alterações químicas da formulação, decréscimos podem estar relacionados a oxidação da fase oleosa com a formação de cadeias oxidadas, hidrólise de triglicerídeos ou degradação de princípios ativos. Em nosso estudo não foi possível relacionar essa alteração com a degradação dos princípios ativos, pois os mesmos se mantiveram estáveis durante o período de avaliação para todas as formulações, nas condições do estudo (MORAES, 2012; MASMOUDI, *et al.*, 2005).

A quantificação dos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT** por qRMN, método validado no Capítulo 1 desse trabalho, proporcionou informações sobre a estabilidade química dos filtros. As formulações **BMBM+R-**; **BMBM+R0**; **BMBM+R+** foram preparadas com os filtros **BMBM** a **5,0% (p/p)** e **EHMC** a **10,0% (p/p)**, já a formulação **BEMT5** tinha, adicionalmente em sua composição, o filtro **BEMT** na concentração de **5,0% (p/p)**. O método empregado para a quantificação dos filtros confirmou que as formulações foram preparadas nas concentrações propostas sem variações relevantes entre elas. Essa informação confirmou a mesma condição inicial para todas e possibilitou que as observações dos outros parâmetros como atividade antioxidante e eficácia fotoprotetora *in vitro* fossem observadas e correlacionadas com a adição das diferentes substâncias fotoestabilizadoras. As condições empregadas no estudo não provocaram alterações químicas significativas ($p < 0,05$) nos filtros **BMBM**, **EHMC** e **BEMT**. As concentrações iniciais se mantiveram estáveis mesmo nas condições consideradas extremas, **45,0 ± 2,0 °C, ciclo e ambiente** com radiação solar direta e indireta, **Tabelas 11 a 14**. Os fenômenos mais comuns de degradação dessas moléculas como isomerização do EHMC e tautomerização do BMBM não foram observados. Os espectros de ¹H RMN não apresentaram adição ou subtração de picos, comprovando a estabilidade dos filtros veiculados nas emulsões frente as diferentes condições estabelecidas no teste.

Os resultados da avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* e da fotoestabilidade das formulações indicaram que, dentre as quantificações avaliadas para este parâmetro, o FPS *in vitro*, foi o que apresentou as maiores variações observadas. Destacamos o comportamento da formulação **BMBM+R+** que proporcionou declínio do FPS *in vitro* para todas as condições do teste. As outras formulações **BMBM+R-**; **BMBMR0** e **BEMT5** não apresentaram esse comportamento, apresentando pequenas elevações ou mantendo-se nos valores iniciais. Nenhuma dessas alterações foram consideradas estatisticamente significativas, sendo assim, todas as formulações foram consideradas estáveis para este parâmetro. Os valores da manutenção deste após a irradiação, para cada formulação, também, não apresentaram modificações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de acordo com a variação da condição de armazenamento.

O parâmetro λ_c proporcionou alterações máximas de $\pm 0,26$ % dos valores iniciais e a porcentagem de manutenção após a irradiação apresentou variação máxima de 0,90% ao final do estudo para todos os parâmetros. Durante o estudo, todas as formulações mantiveram λ_c acima do 370,0 nm, antes e após a exposição a radiação UV. Essa valor é um fator considerado para a classificação de formulações de amplo espectro. Apesar disso, a análise estatística deste parâmetro considerou essas alterações significativas ($p < 0,05$).

A razão UVA/UVB variou de acordo com as condições do estudo. Para as formulações **BMBM+R-** e **BMBM+R0** estas alterações não foram significativas ($p > 0,05$). Para **BMBM+R+** e **BEMT5** a condição $45,0 \pm 2,0$ °C elevou os valores e a **condição ambiente** diminuiu a **razão UVA/UVB**, essas diferenças foram estatisticamente significativas. Este parâmetro relaciona a proteção nas regiões UVA e UVB, possivelmente tivemos a diminuição da proteção UVA ou elevação da proteção UVB. Estas formulações continham como filtros que atuam na região UVA o BMBM e o BEMT, além do EHMC, que atua na região UVB. Na quantificação dos filtros por RMN, estas alterações não foram detectadas, pois a comparação entre os resultados obtidos no início do estudo com aqueles no final do estudo, para todas as condições aplicadas, não

resultou em diferenças estatisticamente significativas. Sendo assim, as alterações verificadas para o parâmetro razão UVA/UVB foram atribuídas às diferenças de homogeneidade das emulsões, verificadas visualmente, provocadas pelas condições extremas oferecidas pelas condições **45,0 ± 2,0 °C** e **ambiente**.

Confirmando os resultados obtidos na avaliação da fotoestabilidade, item 5.2, a adição da **rutina** nas duas concentrações **0,1** e **1,0%** elevaram a fotoestabilidade das formulações para o parâmetro FPS *in vitro*, com nível de significância $p < 0,001$. Adicionalmente, a emulsão identificada como **BEMT5**, que continha o filtro **BEMT** como fotoestabilizador, na concentração de 5% (p/p), também, proporcionou elevação da fotoestabilidade da formulação. Nesse caso a diferença entre a formulação **BMBM+R-**, isenta de fotoestabilizador e a **BEMT5** foi de **15,9%** em relação ao FPS *in vitro* inicial, antes da irradiação da amostra. Fotoestabilizadores como o **BEMT** são conhecidos por proporcionarem elevação da fotoestabilidade de formulações que contem a combinação **BMBM** e **EHMC**. No trabalho desenvolvido por Chatelain & Gabardi, (2001) este filtro promoveu 100% de conservação do FPS *in vitro* inicial após irradiação de 30 MED, irradiância 1 MED min⁻¹. A degradação, também, foi avaliada pela recuperação dos filtros após a irradiação das formulações e o resultado demonstrou que a adição do **BEMT** proporcionou elevação da fotoestabilidade do BMBM de 44,0 para 83,0% e do EHMC de 35,0 para 68,0%. O resultado obtido por Chatelain & Gabardi para a porcentagem de recuperação do filtro EHMC adicionado do BEMT após a irradiação, é comparável ao valor da manutenção do FPS *in vitro* encontrado em nosso trabalho. Diferenças experimentais como formulação base e fonte de irradiação podem ter promovido diferenças nos valores de manutenção do FPS *in vitro*, uma vez que em nossa pesquisa não obtivemos 100% de manutenção do FPS *in vitro* após exposição a radiação UV.

A atividade antirradicalar das formulações foi avaliada a partir do ensaio com o radical livre instável DPPH[•]. Esse radical se estabiliza recebendo um elétron ou radical hidrogênio e resulta na alteração da cor da solução púrpura

do radical estável, possibilitando a correlação da variação da absorbância em função da atividade antirradicalar.

A adição da **rutina** nas formulações fotoprotetoras, tanto na menor concentração (**0,1% p/p**) quanto na maior (**1,0% p/p**) influenciou de forma relevante os resultados obtidos. As formulações isentas de rutina, **BMBM+R-** e **BEMT5**, apresentaram baixos valores de inibição do radical DPPH^{*}, entre **7,8** e **13,6%**, uma vez que as preparações adicionadas de **rutina 0,1 e 1,0% p/p** apresentaram valores de, no mínimo, **72,4** e **90,6%**, respectivamente, resultados compatíveis com literatura (MORAES, 2012). Esse comportamento era esperado, pois um dos principais benefícios da adição de flavonoides em formulações de uso tópico é sua ação antioxidante.

Os valores obtidos apresentaram variações ao final do período da avaliação. Para a formulação **BMBM+R+**, que continha **1,0% p/p** rutina, foi observada variação máxima de 2,5% do valor inicial para a condição **45 ± 2,0 °C**. Estatisticamente, esta alteração não foi significativa e a formulação foi considerada estável para este parâmetro. A formulação **BMBM+R0** apresentou elevação da inibição do radical livre em todas as condições avaliadas, sendo que a maior alteração, 8,8% ocorreu para a condição **5 ± 2,0 °C**, variação não foi estatisticamente significativa e corroborou com a literatura. Moraes, 2012, também, observou elevação do valor inicial da atividade antirradicalar para formulações adicionadas de rutina no 15º. de avaliação durante o *Teste de Estabilidade Normal*. Flavonoides são sensíveis a presença de íons metálicos, radiação UV, elevação da temperatura e hidrólise.

Em um estudo conduzido por Baby e colaboradores (2007) a estabilidade de formulações contendo flavonoide em veículo emulsionado foi avaliada em diferentes condições de armazenamento. Na temperatura mais elevada **40,0 ± 0,5 °C** foi constatada a degradação do flavonoide a partir do 3º dia, sendo que no 15º dia o processo de degradação havia alcançado em torno de 12,0% do valor inicial. Este estudo demonstrou que mesmo em avaliações de curta duração podem ser observadas alterações relevantes sobre formulações adicionadas de flavonoides.

Em nosso trabalho a presença do flavonoide não foi quantificada, mas sim sua funcionalidade quanto a atividade antirradicalar e fotoestabilizadora foram monitoradas. Os resultados indicaram ambas se mantiveram estáveis mesmo para as condições consideradas mais extremas.

Ao final do teste de estabilidade, todas as formulações avaliadas foram consideradas estáveis, pois as variações observadas não prejudicaram o desempenho funcional (fotoproteção *in vitro* e atividade antirradicalar) de nenhuma delas. Os resultados indicaram que a formulação **BMBM+R+** apresentou melhor desempenho em relação as formulações **BMBM+R-** e **BMBM+R0**. Adicionalmente, os resultados de fotoestabilidade *in vitro* da formulação **BMBM+R+** foram comparáveis aos obtidos para a formulação **BEMT5**, com a vantagem da formulação adicionada de rutina apresentar elevada atividade antirradicalar.

6 – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento, a avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* e avaliação da fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras adicionadas ou não de rotina, possibilitou verificar que a presença da rotina colaborou na manutenção da fotoproteção diante da exposição à radiação UV, artificial e natural.

Dentre as formulações avaliadas, com diferentes combinações dos filtros BMBM (BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE) (UVA) e EHMC (ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE) (UVB), concentração fixa 10,0% p/p, somente as formulações que continham o filtro UVA na maior concentração (5,0% p/p), e o filtro UVB citado preencheram os pré-requisitos de amplo espectro, ou seja, FPS igual ou maior a 15 e comprimento de onda crítico (λ_c) maior que 370 nm. Quando expostas a radiação artificial, dose de 192 kJ m⁻², irradiância 209,2 W m⁻², faixa de 300 e 800 nm e temperatura de 37 ± 2,0 °C, a formulação não adicionada de rotina apresentou 53,9% (valor médio) de manutenção do FPS *in vitro* e a adição da rotina na menor (0,1% p/p) ou maior (1,0% p/p) concentração elevou esse valor para 65,8 e 70,8%, respectivamente.

A comparação dos resultados da avaliação da fotoestabilidade das formulações **BMBM+R-**, **BMBM+R0**, **BMBM+R+** e **BEMT5** expostas à radiação artificial e natural demonstraram que os resultados qualitativos foram comparáveis para as duas condições. A exposição à radiação natural confirmou a elevação da fotoestabilidade das formulações adicionadas de rotina ou do fotoestabilizador **BEMT** em relação à formulação não adicionada das duas substâncias. Os tempos de exposição foram diferenciados, sendo 15 min para a exposição artificial e 40 min para a natural.

Ao final do *Teste de Estabilidade Acelerada*, as características das formulações quanto as diferenças relacionadas a fotoproteção *in vitro*, fotoestabilidade, e atividade antirradicalar foram mantidas. A condição **45,0 ±**

2,0 °C provocou alterações estatisticamente significativas para os valores de pH e razão UVA/UVB. Para a formulação **BMBM+R+** ocorreu diminuição do valor de pH de 6,5 para 6,3 (3,0%). Nesta condição, o parâmetro razão **UVA/UVB** foi alterado para as formulações **BMBM+R+** e **BEMT5**, que apresentaram elevação de 0,779 para 0,805 e de 0,803 para 0,837, respectivamente. A adição da **rutina** nas formulações fotoprotetoras, tanto na menor concentração (**0,1% p/p**) quanto na maior (**1,0% p/p**) influenciou de forma relevante os resultados obtidos na inibição do radical DPPH[•]. As formulações isentas de rutina, **BMBM+R-** e **BEMT5**, apresentaram baixos valores de inibição do radical DPPH[•], respectivos de **7,8** e **13,6%**, uma vez que as formulações adicionadas de **rutina 0,1** e **1,0% p/p** apresentaram valores de inibição do radical iguais **72,4 (BMBM+R-)** e **90,6% (BMBM+R+)** e não foram registradas alterações estatisticamente significativas para este parâmetro durante a avaliação da estabilidade.

Todas as formulações avaliadas no *Teste de Estabilidade Acelerada* foram consideradas estáveis, pois as variações observadas não prejudicaram o desempenho funcional (fotoproteção *in vitro* e atividade antirradicalar) de nenhuma delas. Considerando a fotoestabilidade e a atividade antirradicalar, os resultados indicaram que a formulação **BMBM+R+** apresentou melhor desempenho em relação as formulações **BMBM+R-** e **BMBM+R0**.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL. **Resolução RDC n.237, de 22 de agosto de 2002.** Regulamento técnico sobre protetores Solares em Cosméticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/237_02rdc.pdf. Acesso em: 23 mar. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cosméticos. **Proteção solar: sua pele merece esse cuidado.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/prot_solar/index.htm. Acesso em: 06 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos:** uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2008. 120p. (Séries Temáticas: Qualidade, 1).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** 1.ed. Brasília: ANVISA, 2004. 47p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2006.** Aprova Regulamento Técnico, Lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/de350b804aee4112b762bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+48,+de+16+de+mar%C3%A7o+de+2006.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jul. 2011.

AHN, S.; YANG, H.; LEE, H.; MOON, S.; CHANG, I. Alternative evaluation method in vitro for the water-resistant effect of sunscreen products. **Skin Research and Technology**, v.2, n.14, p.187-191, 2008.

ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; ROS, S.; BULHÕES, L.O.S.; CARVALHO, L. M.; BECK, R. C.R. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v.5, n.10, p.1603-1610, 2010.

AL-RAWASHDEH, N. A. F.; AL-SADEH, K.S.; AL-BITAR, M. B. Inclusion complexes of sunscreen agents with b-cyclodextrin: spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of spectroscopy**, v.2013, 2013.

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

ANDREASSI, M.; ANLSEMI, C. Hot topics on UV filter ingredients. **Expert Reviews Dermatology**. v.6, n.5, p.493-499, 2011.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. JR. **Farmacotécnica**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p.

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

AUSTRALIA. Australian Government Department of Health and Ageing For further information. National Skin Cancer Awareness Campaign. In:____. **Overview of the National Skin Cancer Awareness Campaign**, Austrália, 2010. Disponível em: <http://www.skincancer.gov.au/internet/skincancer/publishing.nsf/Content/home>. Acesso em: 08 set. 2011.

AUSTRALIA. Australian Government Department of Health and Aging. Therapeutic Goods Administration. **Australian regulatory guidelines for sunscreens**. Versão 1.0, novembro de 2012. Disponível em: <http://www.tga.gov.au/pdf/sunscreens-args.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2012.

BABY, A.R. **Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rotina em emulsões cosméticas**. São Paulo, 2007. 170p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BABY, A.R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonóides totais**. São Paulo, 2005. 159p. Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.r. estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p.233-248, 2008.

BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V. PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.3, p.405-412, 2007.

BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. São Paulo, 2011. 244p. Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p 679-688, 2009.

BARRETO, M. **Causes and prevention of rutin (quercetina-3-Orhamnoglucoside) crystal deposition in pickled asparagus (*Asparagus officinalis*)**. Arkansas, 2005. 124p. Tese de Doutorado – University of Arkansas.

BECHO, J.R.M., MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina- Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1. n.1, p.21-25, 2009.

BERNEBURG, M.; GREYER-BECK, S.; KURTEN, V.; RUZICKA, T.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; KRUTMANN, J. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.22, p.15345-15349, 1999.

BIMCZOK, R.; GERS-BARLAG, H.; MUNDT, C.; KLETTE, E.; BIELFELDT, S.; RUDOLPH, T.; PFLUCKER, F.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; JOHNCOCK, W.; KLEBON, B.; WESTENFELDER, H.; FLOSSER-MULLER, H.; JENNI, K.; KOCKOTT, D.; LADEMANN, J.; HERZOG, B.; ROHR, M. Influence of applied quantity of sunscreen products on the sun protection factor--a multicenter study organized by the DGK Task Force Sun Protection. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.20, n.1, p.57-64, 2007.

BONDA, C. Research pathways to photostables sunscreens. **Cosmetics and Toiletries**, v.123, n.2, p. 149-260, 2008.

BONDA, C.; PAVLOVIC, A.; HANSON, K.; BARDEEN, C. Singlet quenching proves faster is better for photostability. **Cosmetics and Toiletries**, v.125, n.2, p.40–48, 2010.

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

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

BRAND-WILLIAMS, W.; BONDET, V. BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, n.6, p. 609-615, 1997.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., W.A.; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, n.2, p.183-190, 2007.

CEBALLOS, J. C.; BOTTINO, M.J. Modelo de estimativa de radiação solar por satélite no CPTEC: versão GL1.2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, XII., 2002, Foz do Iguaçu. **Anais eletrônicos**. Foz do Iguaçu, 2002. Disponível em: http://mtc-m15.sid.inpe.br/col/cptec.inpe.br/walmeida/2003/06.10.13.32/doc/Ceballos_Modelos%20de%20estimativa.pdf. Acesso em 25 ago. 2013.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS. **Índice Ultra violeta**. Disponível em <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>. Acesso em 20 de agosto de 2013.

CHATELAIN E.; GABARD B. Photostabilization of Butylmethoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.3, p.401-406, 2001.

CHAUDHURI, R.K.; LASCU, Z.; PUCETTI, G.; DESHPANDE, A.A; PAKNIKAR, S.K. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n.3, p. 823–828, 2006.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.150, n.3, p.805-817, 2013.

CLARIANT BRASIL - Catálogo de produtos **Functional Chemicals Division**, 2001, 3p.

COQUENET, B. COUTEAU, C. PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potencial sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of Natural Products**, v.71, n.6, p.1117-1118, 2008.

CORRÊA, M.P. **Índice Ultra Violeta: avaliações e aplicações**. São Paulo, 2003. 217p. Tese de Doutorado – Instituto de Astronomia, Geofísica e ciências Atmosféricas – Universidade de São Paulo.

CORRÊA, M.P. **O que é Índice Ultra Violeta (IUV)?** Disponível http://www.master.iag.usp.br/www-cptec/indiceuv/O_que_e_IUV.html. Acesso em 25 ago. 2013.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, v.43, n.6, p.1024-1035, 2000.

DIFFEY, B.L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. **Methods**, v.28, n.1, p.4-13, 2002.

DIFFEY, B.L.; GRICE, J. The influence of sunscreen type on photoprotection. **British Journal of Dermatology**. v.137, n.1, p. 103-105, 1997.

DONDI, D.; ALBINI, A.; SERPONE, N. Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial sunscreens and consequent loss of UV protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.5, n.9, p.835-843, 2006.

ENCICLOPEDIA BRITANICA, galleries. **Akhenaton, Nefertiti, and three daughters**, Photograph. Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/4334/King-Akhenaton-with-his-wife-Queen-Nefertiti-and-three-of>. Acesso em 24 jan 2013.

EUROPEAN COMMISSION. HEALTH AND CONSUMERS. **Annex VI List of UV filters allowed in cosmetic products**. Disponível em: http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results&annex_v2=VI&search. Acesso em 11 fev 2013.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA. **Method for in vitro determination of UVA protection, Guideline 2006**. Disponível em: < <http://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=33%3Amethod-for-in-vitro-determination-of-uva-protection-2011&catid=46%3Aguidelines>. Acesso em 22 ago. 2011.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. COLIPA. **Method for in vitro determination of UVA protection, Guideline 2011**. Disponível em: <http://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html?view=item&id=33%3Amethod-for-in-vitro-determination-of-uva-protection-2011&catid=46%3Aguidelines>. Acesso em 22 ago. 2011.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. **Commission Recommendation on the efficacy of sunscreen products and claims made relating thereto, 2006/247/EC, 2006**. Disponível em: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1409_listaFile_itemName_2_file.pdf. Acesso em: 10 jul. 2011.

EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. **Guidelines for Evaluating Sun Product Water Resistance, 2005**. Disponível em: http://www.cosmeticseurope.eu/advanced-search.html?searchword=Guidelines+for+Evaluating+Sun+Product+Water+Resistance&search_filter=&ordering=&searchphrase=all. Acesso em 18 set. 2011.

FAGEON, L.; MOYAL, D.; COUTET, J.; CANDAU, D. Importance of sunscreen products spreading protocol and substrate roughness for in vitro sun protection factor assessment. **International Journal of Cosmetic Science**, v.31, n.6, p.405-418, 2009.

FILIFE, P.; SILVA, J.N.; HAIGLE, J.; FREITAS, J.P.; FERNANDES, A.; SANTUS, R.; MOLIÈRE, P. Contrasting action of flavonoids on phototoxic effects induced in human skin fibroblasts by UVA alone or UVA plus

cyamemazine, a phototoxic neuroleptic. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.4, n.5, p.420-428, 2005.

FILIZOLA, B. G. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável da fava d'anta**. 1. Ed. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2013. 76p.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORRÊA, M .A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n.5, supl.2, p 133-138, 2008.

FOSTER, T.; RYBINSKI, W.V. Applications of emulsions. In: BINKS, B.P., ed. **Modern aspects of emulsion science**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. Cap.12, p.395-406.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.178-182, 2005.

GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of diferente UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 307, v.2, p. 123-128, 2006.

GASPAR, L.R., MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, n.1, p.35-44, 2003.

GIOKAS, D.L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: from sunscreen to human body and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.5, p.360-374, 2007.

GONZALEZ, H. D. Photostability of sunscreen combinations containing avobenzone exposed to natural and artificial ultraviolet light. **Journal of American Academy Dermatology**, v.64, n.2, supl.1, p.AB30, 2011.

GONZALEZ, H. D.; PECHKO, A. P.; KALAFSKY, R. **Photostable sunscreen compositions and methods of stabilizing**. United States Patent, número 6.440.402 B1, 2007.

GRANT, W.B.; HOLICK, M.F. Benefits and Requirements of Vitamin D for Optimal Health: A Review. **Alternative Medicine Review**, v.10, n.2, p.94-111, 2005.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D.T.; PIRES, D.C.; LOPES, J.N.C.; LIMA, L.M. GIANELLA NETO, D. SUSTOVICH, C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de Mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v.32, n.3, p.717-721, 2009.

HARBORNE, J.B. The flavonoids. In: _____(Ed.). **The flavonoids: advances in research since 1980**. London, New York: Chapman & Hall, 1988. 621p.

HART, P. H.; GORMAN, S. FLINAY-JONES, J.J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? **Nature**, v.11, n.9 p.,584 – 596, 2011.

HENRIQUES, B. G. **Desenvolvimento e avaliação de preparações lipossomais contendo filtros solares sólidos UVA e UVB**. Rio de Janeiro, 2008. 174p. Dissertação de mestrado- Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HOCKBERGER, P.E. A history of ultraviolet photobiology for humans animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, n.6, p.561-579, 2002.

HUONG, S. P.; ROCHER, E.; FOURNERON, J.; CHARLES, L.; MONNIER, V. BUN, H. ANDRIEU, V. Photoreactivity of the sunscreen butylmethoxydibenzoylmethane (DBM) under various experimental conditions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.196, n.1, p.106-112, 2008.

IANNUCELLI, V.; SALA, N.; TURSILLI, R.; COPPI, G.; SCALIA, S. Influence of liposphere preparation on butyl-methoxydibenzoylmethane photostability. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.63, n.2, p.140-145, 2006.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.** v.143, n.6, p.35-38, 74, 1988.

KLEIN, K. A Review of Current Sunscreen Formulation Techniques and Technology - A review of sunscreen formulations. **Cosmetics and Toiletries**, v.115, n.6, p. 53-58, 2000.

KOCKLER, J. OELGEMOLLER, M.; ROBERTSON, S. GLASS, B.D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Phtobiology C: photochemistry reviews**, v.13, n,1, p. 91-110, 2012.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M.R. Photoprotection. **The Lancet**, v.370, n.9586, p.528-537, 2007.

LOWE, N.J. An Overview of Ultraviolet Radiation, Sunscreens, and Photo-Induced. Dermatoses. **Dermatologic Clinics**, v.24, n.1, p.9-17, 2006.

MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**.117p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solarsimulated radiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 2, p.256-262, 2001.

MANAIA, E. B.; KAMINSKI, R. C. K.; CORRÊA, M. A.; CHIAVACCI, L. A. Inorganic UV filters. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2 p. 201-209, 2013.

MANSUR, J.S.; BREDER; M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY; R. D. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v.61, n.4, p.121-24, 1986.

MASMOUD, H.; DRÉAU, Y.L.E. PICCERELLE, P. KISTER, J. The evaluation of cosmetics and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**. v.289, n.1-2, p.117-131, 2005.

MASNEC, I. S.; PODUJE, S. Photoaging. **Collegium Antropologicum**, v. 32, n. 2, p. 177-180, 2008.

MCKENZIE, R.L.; LILEY, J. B.; BJÖRN, L. O. UV radiation: balancing risks and benefits. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 88-98, 2009.

MORAES, C.A.P. **Síntese e avaliação da segurança *in vitro* da rutina e do succinato de rutina visando sua incorporação em formulações fotoprotetoras eficazes associados a filtros químicos e físico**. São Paulo, 2011, 210p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MOYAL D. How to measure uva protection afforded by sunscreen products. **Expert Review of Dermatology**, v.3, n. 3, p.307-313, 2008.

MOYAL, D. The development of efficient sunscreens. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v.78, n.7, p.31-34, 2012.

MOYAL, D. UVA protection labeling and *in vitro* testing methods. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n.4, p.516-523, 2010.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B.S. Photostability of the suncreening agent 4-tert-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry**, v. 200, n.2-3, p.410-420, 2008.

NASH, J.F.; TANNER, P. MATTS. Ultraviolet A radiation: testing and labeling for sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v.24 n.1, p.63-74, 2006.

NISHIKAWA, D.O. PERES, D.D., OLIVEIRA, C.A.; SILVA, V.R.L.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R.; ROLIM, A.R. Stability and efficacy of

sunscreens containing inorganic filters and quercetin. **Biomedical Biopharmaceutical Reserach**. v. 10, n.1; p.91-100, 2013.

NUNES, J. D.; NERY, P. .S.; FIGUEIREDO, L.S.; COSTA; C. A.; MARTINS, E. R. O extrativismo da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) na região do Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.14, n.2, p.370-375, 2012.

OLIVEIRA, D. A.; PAULA, M. F.B.; PIMENTA, M A S.; BRAGA, R. F.; FERREIRA, M. F. M.; RODRIGUES, L. A. Variabilidade genética de populações da Fava D'anta (*Dimorphandra mollis*) da região Norte do estado de Minas Gerais. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.32, n.2, p.355-363, 2008.

PANGNAKORN, P.; NONTHABENJAWAN, R.; EKGASIT, S. THAMMACHAROEN, C.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P. Monitoring 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate photoisomerization on skin using attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.61, n.2, p. 193-198, 2007.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V., JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M. Á. A blocked diketo form of avobenzene: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n. 1, p.178-184, 2009.

PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v.23, n.3, p. 153-160, 2001.

PEARSE, A. D.; EDWARDS, C. Human stratum corneum as a substrate for *in vitro* sunscreen testing. **International Journal Of Cosmetic Science**, v.15, n 6, p. 234-244, 1993.

PELIZZO, M. ZATTRA, E. NICOLOSI, P. PESERICO, A. GAROLI, D. ALAIBAC, M. In vitro evaluation of sunscreens: na update for clinicians. **ISRN Dermatology**, v. 2012, 4 paginas, 2012. Disponível em <<http://www.hindawi.com/isrn/dermatology/2012/352135/>>. Acesso em 27 dezembro 2012.

PERUGINI, P;. SIMEONI, S.; SCALIA, S.; GENTA, I.; MODENA, T.; CONTI, B. PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agente, 2-ethylhexyl-*r*-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, n.246, v.1-2, p.37-45, 2002.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

PINTO, C.A.S.O, **Estudo comparativo da estabilidade de formulações cosméticas contendo papaína livre e modificada**. 128p. Dissertação de

Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PISSAVINI, M.; ALARD, V.; HEINRICH, U.; JENNI, K.; PERIER, V.; TOURNIER, V.; LUTZ, D.; MELONI, M.; KOCKOTT, D.; FERRERO, L.; GONZALEZ, B.; ZASTROW, L.; TRONNIER, H. In vitro assessment of water resistance of sun care products: a reproducible and optimized *in vitro* test method. **International Journal of Cosmetic Science**, v.29, n.6, p.451-460, 2007.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. p.597-668.

RAI, R.; SRINIVAS, C. R. Photoprotection. **Indian Journal Dermatology, Venerology and Leprology**, v.73, n.2, p.73-79, 2007.

RIBEIRO, A.M.; KHURI, E. GOTTARDI, D. **Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos**. In: Anais do 10º. Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos. São Paulo, 1996, p.349-375.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. São Paulo: Ed. Pharmabooks, 2006, p.77-120.

RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 86p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROLAND, I.; PIEL G., DELATTRE, L.; EVRARD, B.; systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.263, n.1-2, p.85–94, 2003.

RUDOLPH T. Uva protection assessment of sunscreens: a critical review on the uva-to-uvb absorbance ratio. **Söfw Journal**, v.130, n.9, p.28-35, 2004.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.64, n.4, p.748-758, 2011.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F.A. A procedure to measure the ntiradical efficiency of polyphenols. **Journal of Science of food and agriculture**, v.76, n.2, p.279-276, 1998.

SAYRE RM, STANFIELD J, BUSH AJ, LOTT DL. Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. **Photodermatology Photoimmunology And Photomedicine**, v.17, n.6, p.278-283, 2008.

SAYRE, R. M.; DOWDY, J.C.; GERWIG, A. J.; SHIELDS, W. J.; LLOYD, R. Unexpected Photolysis of the Sunscreen Octinoxate in the Presence of the

Sunscreen Avobenzene. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, n.2, p.452-456, 2005.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Performance of six sunscreen formulations on human skin: a comparison. **Photochemistry And Photobiology**, v.115, n. 1, p.46-49, 1979.

SCALIA, S. MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetina on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane octyl-methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n.2, p.273-278, 2010.

SCHAEFER, H.; MOYAL, D. FOURTANIER, A. State of the art sunscreens for prevention of photodermatoses. **Journal of Dermatological Science**, v.23, sup. 1, p.62-74, 2000.

SCHALKA, S.; REIS, V.M. S. Sun protection factor: meaning and controversies. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.3, p.507-515, 2011.

SHAATH, N. A. Global developments in skincare ingredients. **Cosmetic and Toiletries magazine**, v.121, n. 6, p.57-66, 2006.

SHAATH, N.A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In:____. LOWE, N.J.; SHAATH, N.A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.3-33.

SHAATH, N.A. Sunscreen evolution. In:____. SHAATH, N.A. **Sunscreens: regulantions and comercial development**. Florida: Taylor & Francis Group, 2005. p.3-17.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K. F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytical Chimica Acta**, v.389, n.2-3, p. 155-164,1999.

TANNER, P. R. Sunscreen product formulation. **Dermatologic Clinics**, v.24, n. 1, p.53-62, 2006.

TARRAS-WAHLBERG, N.; STENHAGEN, G.; LARKO, O.; ROSEN, A.; WENBERG, A.M.; WENNERSTROM. O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. **The Journal of Investigative Dermatology** ,v.113, n.4, p. 547-553, 1999.

TUCHINDA, C.; LIM, H.E.; OSTERWALDER, U. ROUGIER, A. Novel Emerging Sunscreen Technologies. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n.1, p. 105-117, 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Federal Register. Rules and Regulations. 21 CFR Parts 201 and 310. **Labeling and Effectviness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-the Counter Human Use**, v.76, n.117, p. 35610- 35665, 2011.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.. Department of Health and Human Services. **Sun Safety**. Save

your skin!, 2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM143731.pdf>. Acesso em 22 ago. 2011.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.64, n.2-3, p. 99-104, 2001.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) - revisão. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rotina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal Of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

WANG, S. Q.; LIM, H.W. Current status of the sunscreen regulation in the United States: 2011 Food and Drug Administration's final rule on labeling and effectiveness testing. **Journal of the American of Dermatology**, v.65, n.4, p. 863-869, 2011.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Rev.** v.20, n.2/3, p.131-145, 1996.

WOLF, R; WOLF, D.; MORGANTI, P.;RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, v.19 n.6. p.452-459, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Information Series On School Health Document Seven. In:_____.**Sun Protection: An Essential Element of Health-Promoting Schools**, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/school_youth_health/media/en/456.pdf.> Acesso 08 set. 2011.

WRIGHT, M. W.; WRIGHT, S.T.; WAGNER, R. F. Mechanisms of sunscreen failure. **Journal American Academy of Dermatology**, v.44, n. 5, p.781-784, 2001.

YANG, J.; WILEY, C. J. GODWIN, D. A.; FELTON, L. A. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, n.2, p. 605-612, 2008.

Capítulo 3

Avaliação da interação da rutina com os filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (*p*-metoxicinamato de octila) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (avobenzona)

1 - INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

A fotodegradação de filtros em formulações fotoprotetoras é uma preocupação crescente entre os especialistas que atuam na área do desenvolvimento de fotoprotetores. A utilização de produtos ineficazes pode ser mais prejudicial do que sua não utilização, pois induzem os usuários a acreditarem que estão seguros quando expostos ao sol, mas pode não ser verdade. Alguns filtros solares utilizados em grande escala em fotoprotetores são reconhecidamente fotoinstáveis e perdem a eficácia fotoprotetora rapidamente quando expostos à radiação UV (MOYAL, 2012; CHATELAIN & GABARD, 2001). Este comportamento ocorre porque a absorção da energia UV pode provocar alterações moleculares das substâncias fotoprotetoras promovendo a redução e até a perda da proteção frente a radiação UV e, como consequência, ocorre aumento do risco da incidência do câncer e envelhecimento precoce da pele. Além da perda da proteção, a fotodegradação dos filtros orgânicos tem sido investigada como potencial causa de alergia de fotocontato (HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010; KARLSSON *et al.* 2009).

A relevância do tema é evidenciada pela elevada produção científica direcionada a resolução da fotoinstabilidade de filtros UV como o ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (SCALIA & MEZZENA, 2010; BONDA, 2010; KARLSSON *et al.* 2009; MTURI & MARTINCIGH, 2008; HUONG *et al.*, 2008; MTURI, 2005).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

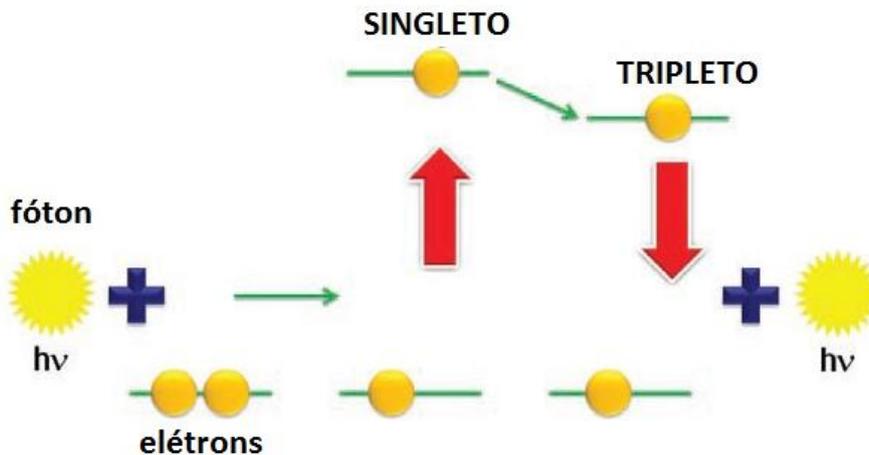
2.1 MECANISMOS DE FOTOESTABILIZAÇÃO DE FILTROS SOLARES

Ao absorverem a radiação UV, as moléculas dos filtros solares orgânicos são eletronicamente excitadas, isto é a absorção de um fóton de luz excita a molécula pela elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia. Antes da absorção do fóton a molécula se encontra no estado fundamental e, após este fenômeno, a população de moléculas é promovida para o estado excitado singleto, onde o *spin* do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original. A molécula pode rapidamente retornar ao estado fundamental emitindo outro fóton, mas normalmente decai para um estado de energia menos excitado denominado estado tripleto de energia, onde a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida e o retorno ao estado fundamental ocorre em velocidade menor, **Figura 1**. Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população que se encontra no estado excitado singleto para o estado fundamental ocorre rapidamente, na ordem de nanossegundos (BONDA, 2009; VOLLHARDT & SCHORE, 2004; DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

O processo se inicia com a absorção do fóton e termina com o retorno ao estado fundamental e este ciclo completo leva alguns milésimos de segundo para se completar. O mecanismo de dissipação de energia nem sempre é completado com o retorno da molécula ao estado fundamental tornando o filtro UV novamente apto para a absorção de mais energia. Quando o processo é ineficiente pode desencadear modificações moleculares que tornam o filtro inapto para a absorção de energia (MOYAL, 2012; BONDA, 2009; DEROSA & CRUTCHLEY, 2002).

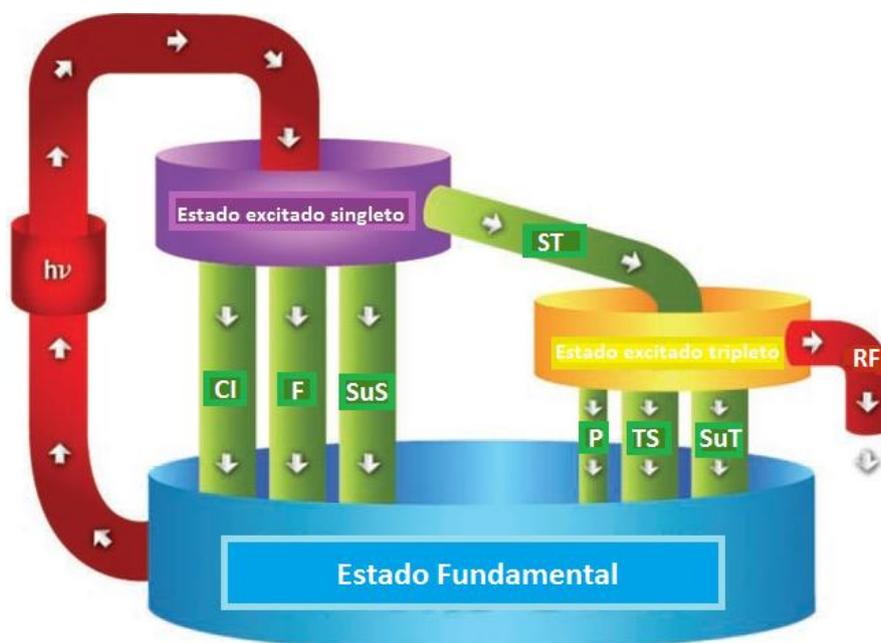
O sistema gráfico DEXSTER, **Figura 2**, desenvolvido pela empresa HallStar Company, representa as vias que a molécula do filtro solar pode tomar para dissipar a energia absorvida (HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010, BONDA, 2009).

Figura 1. Representação do estado fundamental e dos estados excitados singlete e tripleto (adaptado BONDA, 2009).



Onde: h = constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$); ν = frequência de radiação absorvida

Figura 2. Representação gráfica das vias de desativação de energia estado excitado de um filtro solar (adaptado BONDA de 2009, HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010).



Onde: $h\nu$ foi definido na **Figura 1**, **CI** = Conversão Interna; **F** = Fluorescência; **SuS** = Supressão do estado Singlete; **ST** = Singlete para Tripleto (cruzamento inter sistemas), **P** = Fosforescência; **TS** = Tripleto para Singlete (cruzamento inter sistemas), **SuT** = Supressão do Estado Tripleto; **RF** = Reação Fotoquímica

Atualmente, estão disponíveis comercialmente fotoestabilizadores dos filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE que atuam pelas vias de supressão tanto do estado tripleto quanto do estado singleto. Dentre os fotoestabilizadores que atuam pela supressão do estado tripleto destacamos o OCTOCRYLENE, o 4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR, e o BIS-ETHYLHEXYLOXYPHENOL METHOXYPHENYL TRIAZINE, que atuam como receptor da energia do estado tripleto antes que ocorram reações fotoquímicas destrutivas das moléculas dos filtros UV. O ETHYLEXYL METHOXYCRYLENE atua pelo mecanismo de supressão do estado excitado singleto (BONDA, 2008; CHATELAIN & GABARD, 2001).

Scalia & Mezzena (2010) avaliaram a quercetina como substância fotoestabilizadora dos filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE e sugeriram que um dos mecanismos envolvidos na fotoestabilização seria a transferência de energia do estado tripleto. Para propor esse mecanismo os autores se basearam em informações sobre o valor do estado de energia tripleto da quercetina ($239,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) que é próximo dos valores dos filtros BMBM e EHMC, $248,7$ e $239,0 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente, de acordo com a literatura. Segundo Sayre e colaboradores (2005) para ocorrer a transferência de energia é necessário que os níveis de energia do estado tripleto sejam adjacentes (SCALIA & MEZZENA, 2010; HERZOG, WEHRLE & QUASS, 2009; SAYRE *et al.* 2005; DARMANYAN, LEE & Jenks, 1999).

Bonda, 2008, ressaltou que a supressão do estado singleto de energia oferecia algumas vantagens importantes sobre a supressão estado tripleto. Por exemplo, suprimindo o estado excitado de energia enquanto o filtro UV ainda está no estado singleto teremos como consequência a redução da população de moléculas no estado excitado tripleto. Esse mecanismo é bastante relevante, pois é a partir do estado tripleto que a maioria das reações fotoquímicas destrutivas se originam. Além disso, suprimir o estado singleto faz

com a molécula esteja disponível para absorver energia novamente mais rapidamente.

No Capítulo 2 desse trabalho foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras compostas pelos filtros orgânicos ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, a rutina foi utilizada como proposta de substância fotoestabilizadora. Após exposição à radiação UV as preparações adicionadas de rutina apresentaram resultados de conservação da fotoproteção *in vitro* (FPS *in vitro* e λ_c) superiores quando comparados aos valores obtidos para as formulações não adicionadas do flavonoide.

Diante do exposto, esta etapa do trabalho visa avaliar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na fotoestabilização do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE e do BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE pela adição da rutina.

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Avaliar a interação da rutina com os filtros UV ETHYLHEXYL METHOXYCINNA-MATE e BUTYL METHOXYDIBEN-ZOYLMETHANE utilizando técnicas termoanalíticas (DSC e TG), a espectroscopia de RMN e a análise qualitativa da supressão do estado energético singleto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Analisador Termogravimétrico TG/DTA - SII Nano Technology[®], modelo Exstar 7020
- Balança analítica - Sartorius[®], modelo BL -210S
- Célula calorimétrica – SII Nano Technology[®], modelo Exstar 7020
- Célula de referência de silicone monocristalino e janela de sílica fundida - Newport[®], modelo 91150V
- Cubeta de quartz - Hellma[®], modelo 1 cm de caminho óptico
- Espectrômetro- Bruker[®]; modelo DPX300, com sonda multinuclear de 5mm
- Fonte de arco de xenônio – OSRAM, modelo XBO 150/1
- Micropipeta - Labsystems[®]; modelo monocanal, volume variável de 10 a 100 µL
- Micropipeta - Labsystems[®], modelo monocanal, volume variável de 100 a 1000 µL
- Cromatofolhas para cromatografia de camada delgada revestidas com sílicagel60, Merck[®]
- Tubos de vidro para análise RMN - Corning[®]

4.1.2 SOLVENTES

- Dimetil sulfóxido deuterado - DMSO-*d*₆ (D, 99,8%) – Cil, São Paulo
- Metanol P.A. - Merck[®]

4.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS – GRAU DE PUREZA FARMACÊUTICO

- BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM) (98,8%), DSM, São Paulo
- ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) (98,0%), Basf, São Paulo (doação)
- Benzoato de feniletila (98,5%); ISP do Brazil Ltda, São Paulo
- Rutina (98,8%); Pharmanostra, São Paulo

4.1.5 OUTROS MATERIAIS

- Cadinho hermético de alumínio para DSC
- Cadinho de platina para TG

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ANÁLISE TÉRMICA

Os estudos termoanalíticos foram realizados para as amostras de rutina e dos filtros ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC) e BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE (BMBM). Adicionalmente, as misturas binárias rutina com cada um dos filtros (rutina e EHMC ou rutina e BMBM) e a dos dois filtros (EHMC e BMBM), além da mistura ternária (EHMC, BMBM e rutina) também foram avaliadas.

a) CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL - DSC

As curvas DSC foram obtidas em equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial Exstar 7020 – SII Nano Technology[®], empregando-se célula de alumínio selada contendo massa entre 2,0 a 3,0 mg, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹), razão de aquecimento de 5,0 °C min⁻¹, intervalo de temperatura entre 25 e 400 °C. A célula DSC foi calibrada, antes dos experimentos, empregando-se a substância padrão índio metálico, teor 99,94% ($T_{\text{fusão}}=156,6$ °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,7$ J g⁻¹) (ARAUJO, 2009).

b) TERMOGRAVIMETRIA – TG

As curvas TG, para o estudo do comportamento térmico dos filtros BMBM e EHMC e da rutina, além das misturas dos filtros e combinações com a rutina foram obtidas mediante termobalança TGA/DTA 7200 SII Nano technology[®], na faixa de temperatura entre 25,0 e 600,0 °C, sob atmosfera dinâmica de N₂, 100 mL min⁻¹, a razão de aquecimento de 5,0 e 10 °C min⁻¹, utilizando cadinho de Pt e massas de amostra em torno de 5 mg. Antes dos ensaios, foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema e

verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio monoidratado (ARAUJO, 2009).

4.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES CAUSADAS PELA RADIAÇÃO UV UTILIZANDO ¹HRMN

Com intuito de se verificar a influência da presença da rutina nas alterações moleculares ocasionadas pela radiação UV na combinação dos filtros BMBM e EHMC, avaliaram-se as variações espectrais por RMN antes e após a irradiação dos filtros em solução (MTURI, 2005; MTURI & MARTINCIGH, 2008).

Preparam-se soluções dos filtros isolados, combinados entre si, na presença e na ausência da rutina, conforme descrito na **Tabela 1**. Como solvente foi utilizado o DMSO-*d*₆. As amostras foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. As análises foram realizadas antes e após a exposição artificial de radiação UV.

Tabela 1. Soluções avaliadas quanto a alterações moleculares frente à radiação UV.

Identificação da solução	Concentração em mg mL⁻¹		
	BMBM	EHMC	RUTINA
1	80,0	-	-
2	80,0	-	10,0
3	-	160,0	-
4	-	160,0	10,0
5	80,0	160,0	-
6	80,0	160,0	10,0

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBEN-ZOYLMETHANE; **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, - = não adicionada.

As amostras foram irradiadas em duas etapas, nas doses de 3600 e 5760 J cm⁻², respectivamente, utilizando-se uma fonte de luz de arco de xenônio, modelo XBO 6150/1, marca OSRAM, com filtro para 300 a 800nm esta fonte de luz que apresenta características espectrais semelhantes à radiação solar, com o controlador Power Controlled Lamp Supply, Newport Estados Unidos. A irradiância aplicada foi de 200 W cm⁻², medida pela célula

de referência de silicone monocristalino e janela de sílica fundida, modelo 91150V, Newport, Estados Unidos.

4.2.2.1 CONDIÇÕES ANALÍTICAS

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

A análise inicial dos espectros, antes e após a exposição à radiação UV, permitiu observar que as alterações ocorridas para as moléculas dos filtros EHMC e BMBM foram a isomerização e tautomerização, respectivamente.

A razão entre os isômeros da EHMC e tautômeros da molécula BMBM foram calculados pelo método relativo, utilizando-se a **Equação 1** (HOLZGRABE *et al.*, 2005; MTURI, 2005).

$$K = \frac{\% \text{ filtro não modificado}}{\% \text{ filtro modificado}}$$

Equação 1. Cálculo da razão EHMC *trans/cis* e BMBM enol/ceto, **K**=constante de equilíbrio

Os núcleos ressonantes para a quantificação das alterações moleculares foram selecionados a partir das observações das modificações causadas pela

radiação UV nas moléculas avaliadas e estão destacados (cor vermelha) nas **Figuras 3 e 4**, na cor vermelha. Os sinais gerados pelos os hidrogênios selecionados para a quantificação pelo método relativo geraram sinais em 4,72 e 7,18 ppm para as formas cetônica e enólica do BMBM e 5,83 e 6,44 para as formas *cis* e *trans* do EHMC (MTURI & MARTINCIGH, 2008; PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001).

Figura 3. Fórmulas estruturais (enólica e cetônica) do BUTYL METHOXYDIBENZOYL METHANE (BMBM), adaptado de MTURI & MARTINCIGH, 2008.

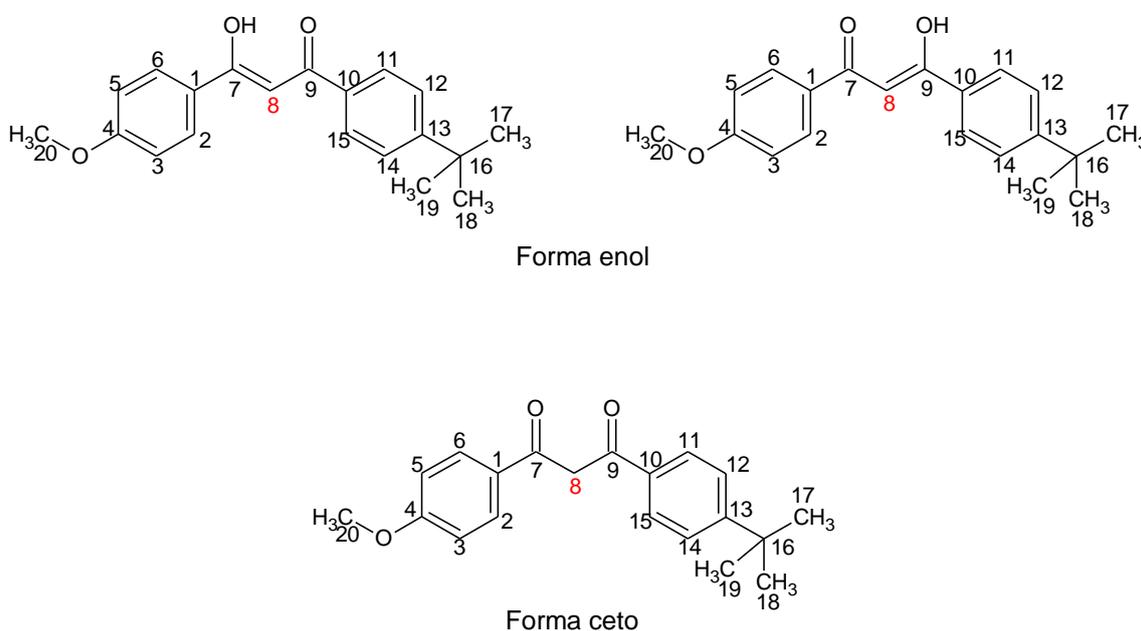
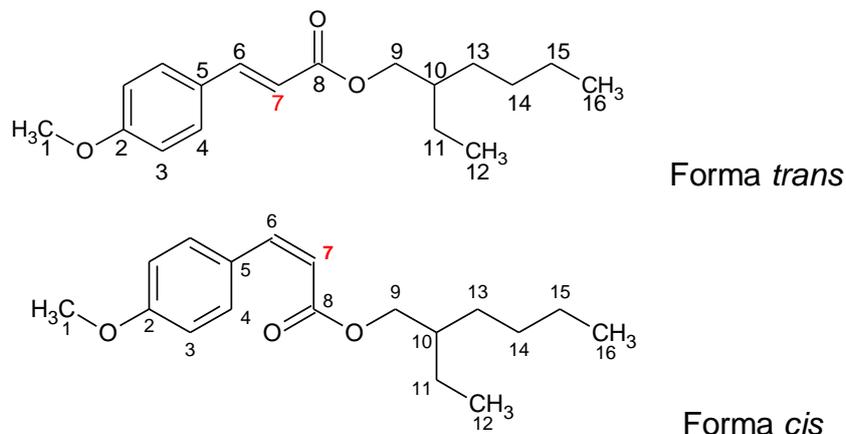


Figura 4. Fórmulas estruturais do ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (EHMC), *trans* e *cis*, adaptado de PATTANAARGSON & LIMPHONG, 2001.



4.2.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA SUPRESSÃO DO ESTADO ENERGÉTICO SINGLETO

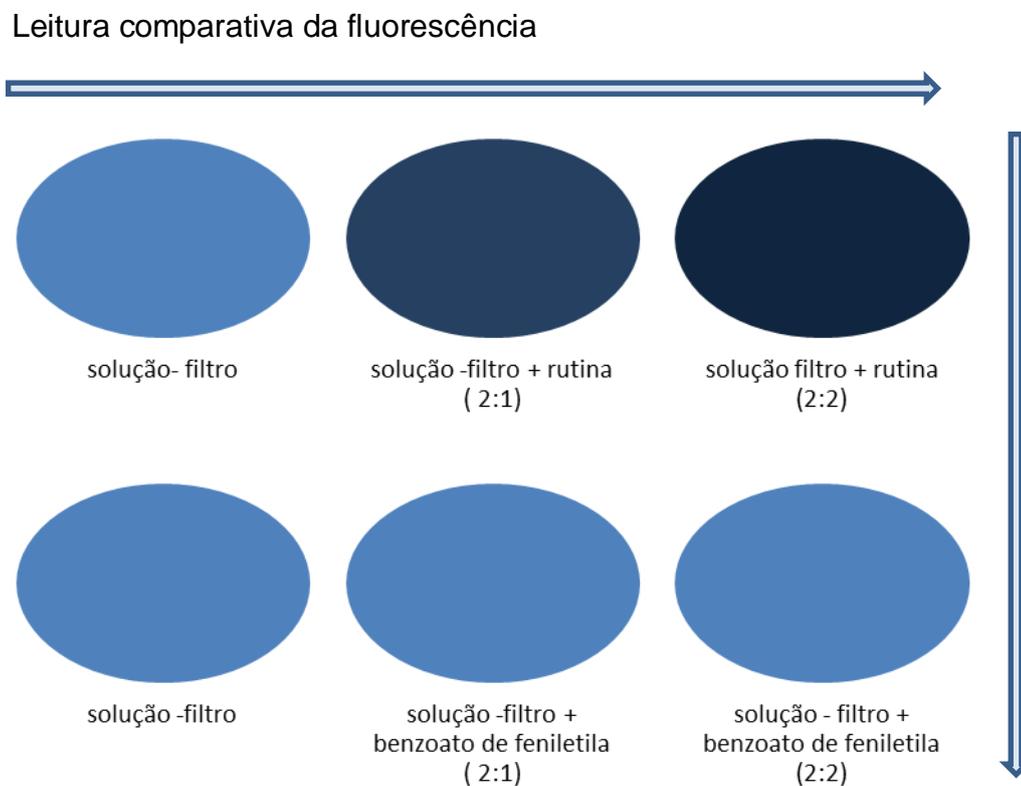
A análise qualitativa da supressão do estado energético singleto do BMBM e do EHMC foi realizada por meio da observação da fluorescência apresentada pelas soluções dos filtros, em metanol, isolados ou combinados com a adição da rutina ou não, dcomo descrito na **Tabela 2**. O benzoato de feniletila foi utilizado como controle negativo por ser um composto fotoquimicamente inerte. As soluções (10 μ L) foram transferidas para uma cromatofolha de cromatografia de camada delgada, revestida com silicagel, conforme **Esquema 1**. Após a evaporação do solvente, aproximadamente, os filtros foram imobilizados na cromatofolha e leitura foi realizada sob fonte de 365 nm. A resposta foi considerada positiva quando as amostras apresentaram intensidade da fluorescência decrescente entre si e menor que o controle negativo (BONDA, 2010; HALLSTAR INNOVATIONS CORP, 2010).

Tabela 2. Soluções dos filtros **BMBM e EHMC** adicionados ou não de rutina.

Identificação da solução	Quantidade adicionada (mg mL ⁻¹)			
	BMBM	EHMC	rutina	benzoato de feniletila
solução teste 1	2,0	-	-	-
solução teste 2	2,0	-	1,0	-
solução teste 3	2,0	-	2,0	-
controle negativo 4	2,0	-	-	1,0
controle negativo 5	2,0	-	-	2,0
solução teste 6	-	2,0	-	-
solução teste 7	-	2,0	1,0	-
solução teste 8	-	2,0	2,0	-
controle negativo 9	-	2,0	-	1,0
controle negativo 10	-	2,0	-	2,0
solução teste 11	1,0	1,0	-	-
solução teste 12	1,0	1,0	1,0	-
solução teste 13	1,0	1,0	2,0	-
controle negativo 14	1,0	1,0	-	1,0
controle negativo 15	1,0	1,0	-	2,0

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, - = não adicionada.

Esquema 1. Distribuição das amostras dos filtros em solução de metanol na cromatofolha para avaliação qualitativa da supressão do estado de energia singleto pela rutina.



5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

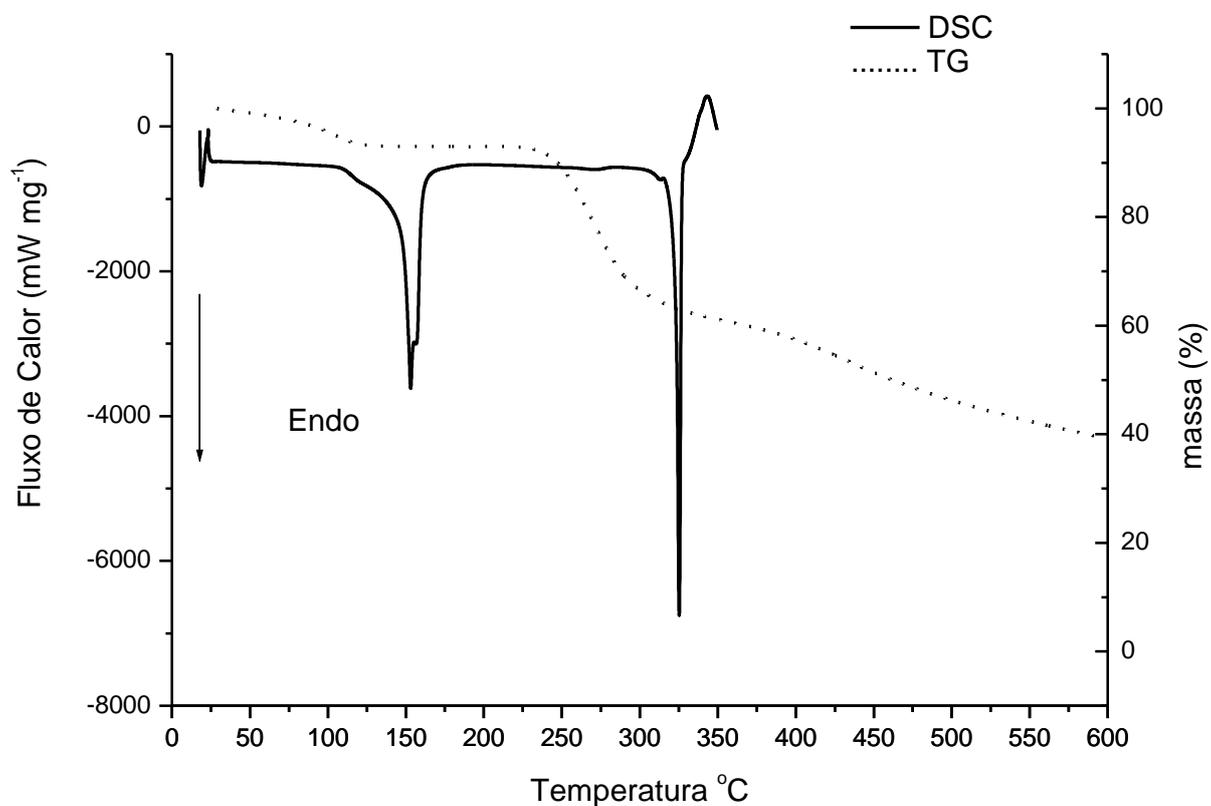
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE TÉRMICA – DSC e TG

A rutina é uma molécula triidratada que apresenta rearranjo da forma hidratada para a anidra. A curva DSC da rutina, **Figura 5**, apresentou dois eventos endotérmicos bem definidos, o primeiro a 153,0 °C, relativo a desidratação do material, que foi confirmado pela curva TG onde se observou perda de massa com início do evento a 127,9 °C. O segundo evento observado na curva DSC da rutina ocorreu a 321,3 °C, este evento, também, apresentou perda de massa, fusão seguida de degradação. Adicionalmente, um evento exotérmico foi observado em 342,1 °C. A curva DSC da rutina revelou semelhanças com as curvas de outros flavonoides como a quercetina e o canferol, que apresentaram, também, dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro atribuído a perda de água e o segundo, com temperaturas acima de 325,1 °C, associados a eventos de fusão (POOL *et al.* 2012; CONEAC *et al.* 2009; FORD & TIMMINS, 1986).

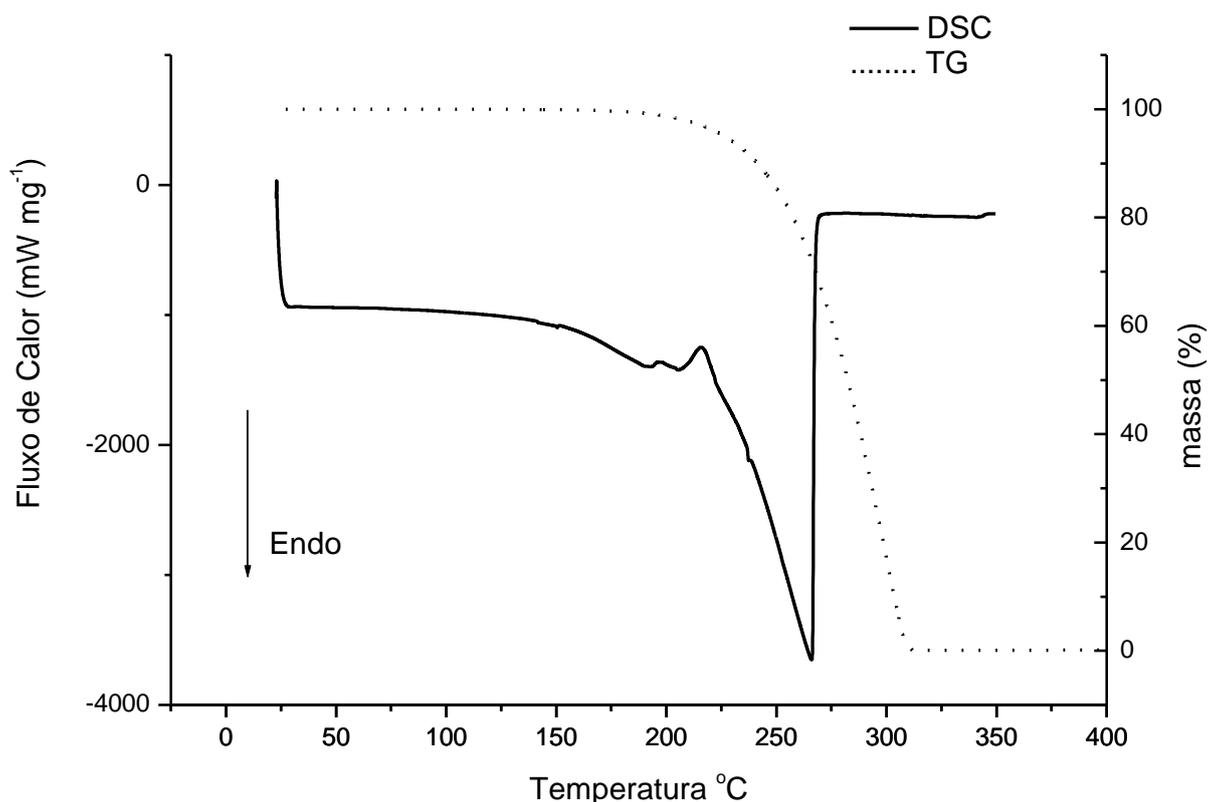
As curvas DSC e TG da rutina são apresentadas na **Figura 5**.

Figura 5. Curvas da **rutina**, **DSC** em atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento a $5,0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e **TG** em atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}) e razão de aquecimento a $10,0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



As curvas DSC, TG do filtro EHMC são apresentadas na **Figura 6**.

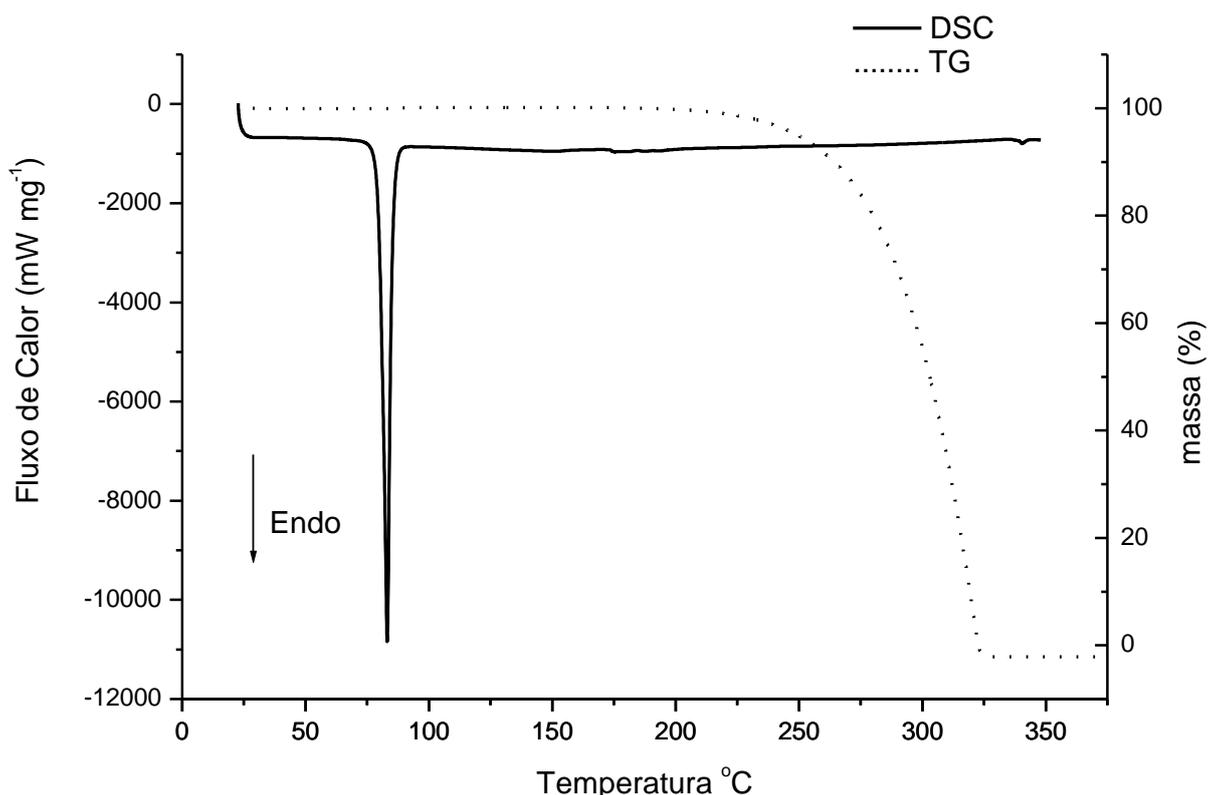
Figura 6. Curvas do **EHMC**, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, **DSC** em atmosfera dinâmica N₂ (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 5,0 °C min⁻¹ e **TG** em atmosfera dinâmica N₂ (100 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min⁻¹.



O EHMC é um líquido levemente amarelado que apresenta decomposição que inicia 215,6 °C; seguido de um evento exotérmico em 266 °C, que indicou decomposição do material, **Figura 6**. A endoterma apresenta valor aproximado ao já divulgado na literatura, com início do evento a 187,0 °C e final a 253,6 °C (SILVA, 2000). Na curva TG um único evento de perda de massa foi registrado, no sentido endotérmico, adicionalmente, foi possível verificar que o EHMC passou pelo processo de perda de massa completa entre 200,0 e 300,0 °C, não restando nenhum resíduo do material após essa temperatura.

Na curva DSC do BMBM, **Figura 7**, foi possível observar um pico endotérmico fino, bem definido em 79,3 °C, relativo a fusão do material. Estes valores são comparáveis aos previamente relatados na literatura, que utilizaram a mesma razão de aquecimento (CERESOLE *et al.*, 2013). Os resultados obtidos pela análise das curvas TG, demonstraram um evento de perda de massa associado à degradação do filtro BMBM à temperatura de 275,9 °C, com perda de massa completa a 325,0 °C.

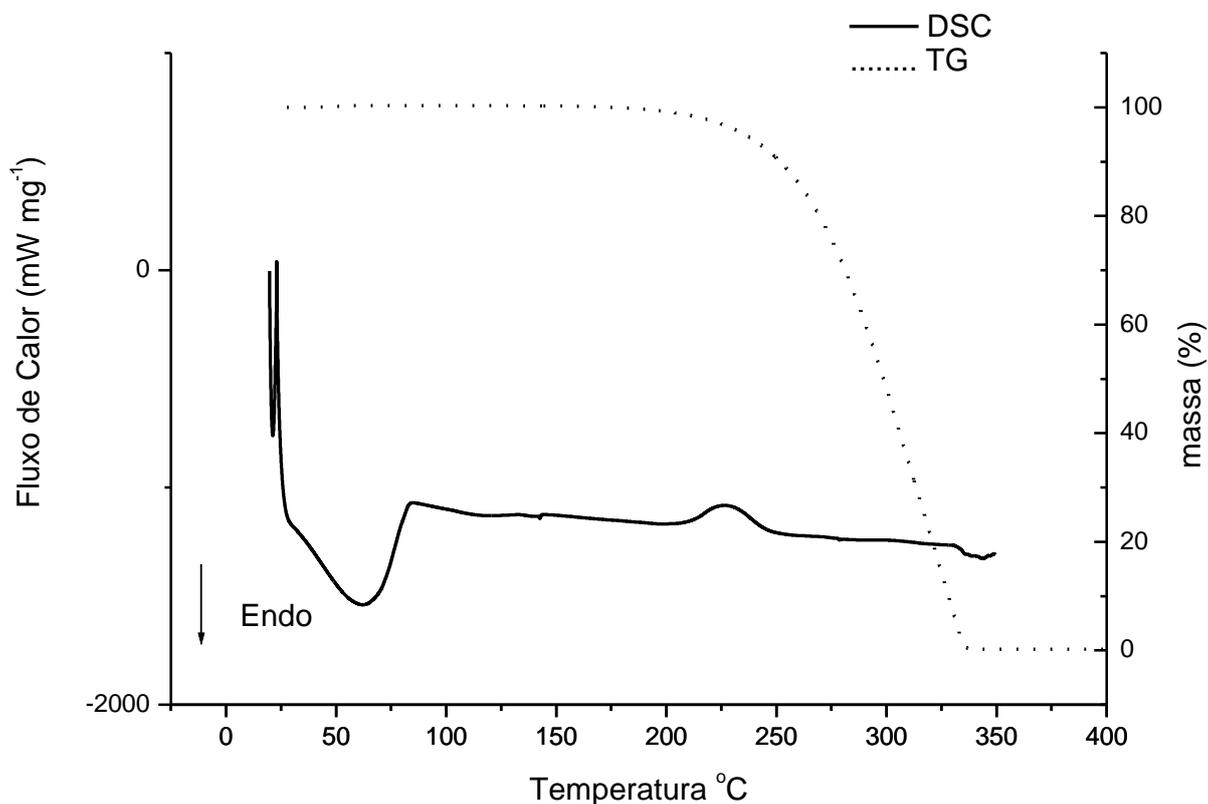
Figura 7. Curvas do **BMBM**, BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, **DSC** em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 5,0 °C min⁻¹ e **TG** em atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min⁻¹.



A **Figura 8** apresenta as curvas DSC e TG da mistura física dos dois filtros EHMC e BMBM (1:1). A curva DSC da mistura física EHMC e BMBM

(1:1) apresentou um evento endotérmico entre 40 a 75 °C, relativo à fusão do BMBM. O segundo evento, exotérmico, ocorreu a 209,0 °C e coincidiu com a perda de massa visualizada nas curvas TG e iniciou a 200 °C. Os eventos térmicos relativos à fusão do BMBM e decomposição dos dois filtros, EHMC e BMBM se apresentaram em temperaturas próximas daquelas encontradas para as substâncias isoladas.

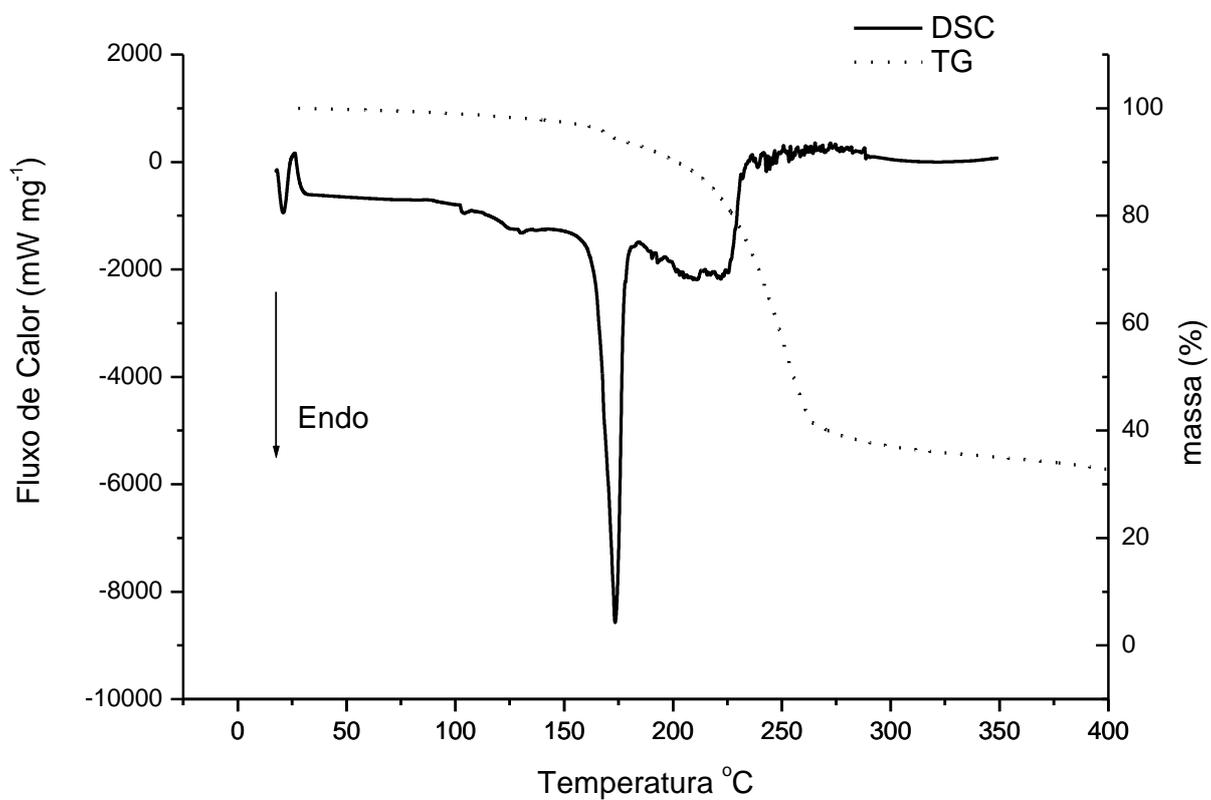
Figura 8. Curvas da mistura simples do **BMBM**, BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, com o **EHMC**, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (1:1), **DSC** em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento a 5,0 °C min⁻¹ e **TG** em atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min⁻¹.



As curvas DSC e TG da mistura física do **EHMC** com a rutina (1:1) são visualizadas na **Figura 9**. Os dois eventos definidos foram atribuídos a perda de água da rutina a 173,4 °C e à degradação do EHMC que ocorreu entre 175,0 e 230,0 °C. Comparando-se a curva DSC individual da rutina, **Figura 5**, com a curva da mistura física **EHMC** e rutina (1:1), **Figura 9**, não foi possível

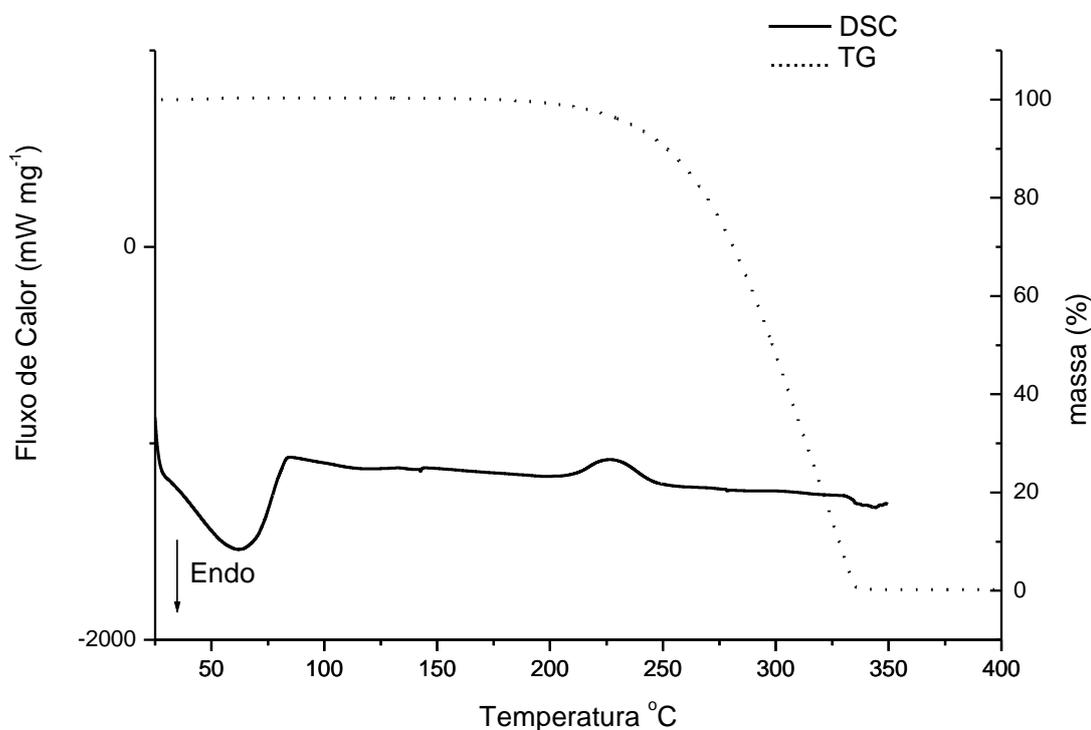
observar o evento endotérmico verificado a 325,1 °C para rutina isolada. Essa alteração indicou, possivelmente, interação entre o EHMC e a rutina.

Figura 9. Curvas da mistura simples do **EHMC**, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, e **rutina** (1:1), **DSC** razão de aquecimento 5,0 °C min⁻¹, razão de aquecimento 5,0 °C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹) e **TG**, em atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min⁻¹.



Na **Figura 10** são visualizadas as curvas DSC, TG da mistura simples BMBM com a rutina (1:1). Esta curva apresentou dois eventos endotérmicos pronunciados, o primeiro em 82,8 °C relativo a fusão do BMBM e o segundo a 177,5 °C atribuído a perda de água pela rutina

Figura 10. Curvas da mistura simples do BMBM, BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, e rutina (1:1), **DSC**, razão de aquecimento 5,0 °C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹) e **TG**, em atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL min⁻¹) e razão de aquecimento 10,0 °C min⁻¹.

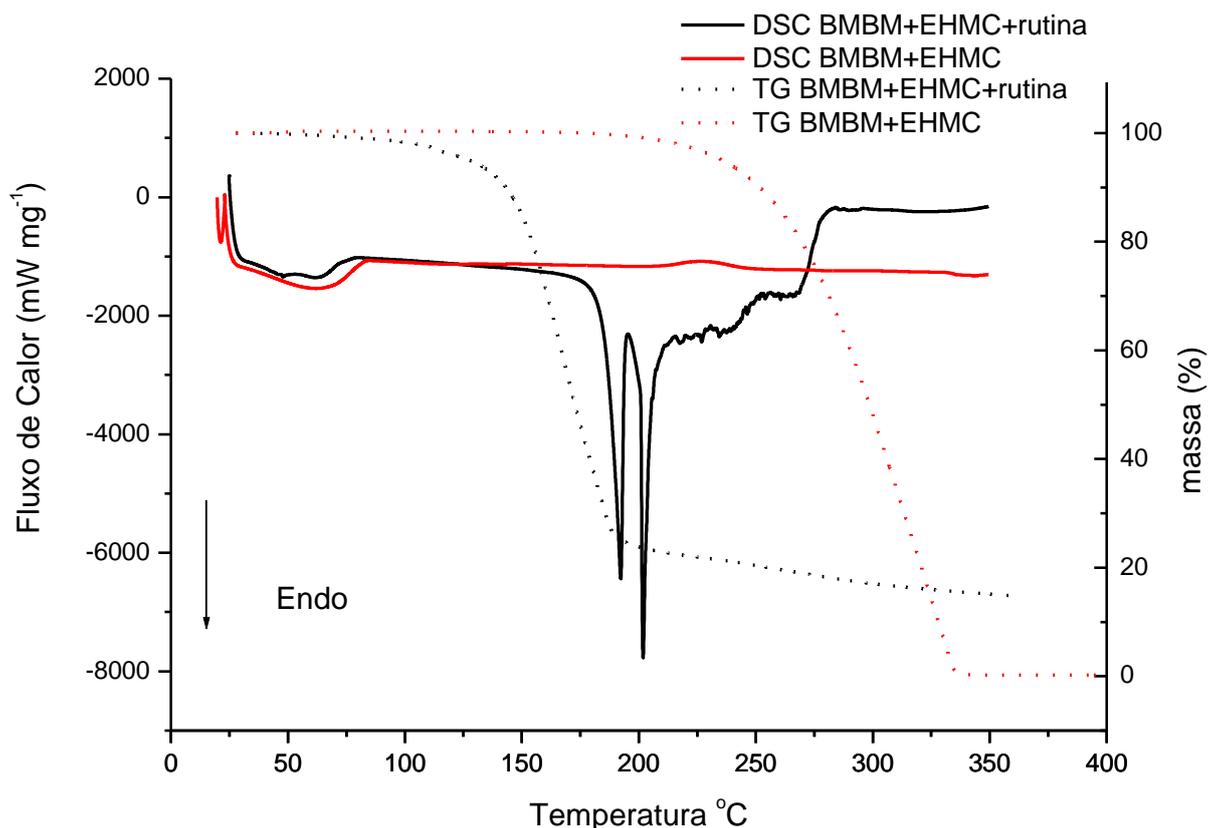


As curvas DSC e TG da mistura física binária dos filtros BMBM, EHMC (1:1) e da mistura ternária BMBM, EHMC e rutina (1:1:1) apresentam-se na **Figura 11** para efeito de comparação. As curvas apresentaram diferenças nítidas quanto aos eventos e suas respectivas temperaturas. O pico de fusão do BMBM foi preservado tanto na presença do EHMC quanto da rutina, com término do evento a 85,0 °C. Os eventos relacionados a perda de massa por evaporação de água da rutina e/ou degradação dos filtros apresentaram temperatura reduzida quando comparados aos registrados na ausência da rutina. É interessante verificar que o filtro EHMC isolado apresentou perda de massa total entre 200 e 300 °C e o filtro BMBM entre 275,9 e 320,0 °C. A mistura binária teve perda total da massa entre 200,0 e 350,0 °C que corresponde aos valores individuais dos filtros. A mistura ternária apresentou perda de massa acentuada entre 77,0 e 188,0 °C, atingindo a aproximadamente 70,0% do valor inicial, após esta temperatura, a perda de massa foi gradual e perceptivelmente mais lenta.

A curva DSC da rutina não adicionada dos filtros BMBM ou EHMC apresentou dois eventos térmicos bem definidos, sendo que o primeiro foi associado a perda de água a 153,0 °C e o segundo a 321,3 °C, a fusão seguida de degradação. A curva DSC da mistura ternária (**BMBM, EHMC e rutina**) não apresentou nenhum evento térmico acima de 300,0 °C. Este comportamento, também, aconteceu para a combinação da rutina com cada um dos filtros (**BMBM e EHMC**) e foi considerado indicativo de interação entre as substâncias.

As Curvas DSC e TG da mistura física binária dos filtros BMBM, EHMC (1:1) e da mistura ternária BMBM, EHMC e rutina (1:1:1) estão representadas na **Figura 11**.

Figura 11. Curvas da mistura binária do **BMBM**, BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, com o **EHMC**, ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (1:1), e da mistura ternária BMBM, EHMC e rutina, **DSC** razão de aquecimento $5,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}) e **TG** em atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}) e razão de aquecimento $10,0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE; **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE

Amostras submetidas a uma variação de temperatura podem apresentar alterações físicas e químicas, reagir com componentes do meio ambiente, perder água de cristalização, além de outros fenômenos. Todas essas transformações são acompanhadas pela perda ou absorção de energia calorífica e podem ser monitoradas proporcionando o conhecimento de informações relevantes das propriedades físicas de diferentes substâncias, bem como sua reatividade em função da temperatura. A Calorimetria

Exploratória Diferencial, DSC, mede a energia calorífica absorvida ou liberada durante o aquecimento ou arrefecimento de uma substância, em relação a uma amostra. A Termogravimetria avalia a variação de massa de uma amostra em função da temperatura e/ou tempo (ALVES, 2007).

A partir dos dados obtidos das análises das curvas DSC e TG das amostras dos filtros UV, isolados e combinados entre si, foi possível inferir que existiu interação entre os filtros BMBM e EHMC com a rutina. Este resultado está de acordo com dados da literatura obtidos por diferentes técnicas analíticas que demonstraram que estes dois filtros associados apresentaram instabilidade química e que esse comportamento é modificado com a adição de flavonoides como a quercetina e o extrato purificado de *Kaempferia galanga* (MOYAL, 2012; GONZALEZ; 2011; SCALIA & MEZZENA, 2010; GONZALEZ, PECHKO & KALAFSKY, 2007).

A avaliação de filtros solares por técnicas de análise térmica foi relatada na literatura, mas a da interação de filtros UV foi usualmente estudada por técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria UV, ressonância magnética nuclear entre outras, mas não existem informações da avaliação por DSC ou TG. Dados disponíveis na literatura relataram que a adição de flavonoides aos filtros UV pode alterar positivamente o desempenho na eficácia fotoproteção e na fotoestabilidade (SCALIA & MEZZENA, 2010; VELASCO *et al.*, 2008). A concordância dos resultados da análise da interação de filtros UV, BMBM e EHMC com a rutina, por DSC e TG, com dados da literatura sugerem a aplicação prática para estas técnicas de análise no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras. As técnicas utilizadas apresentam como principal vantagem a utilização de volume reduzido de amostras e a ausência de utilização de solventes.

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES CAUSADAS PELA RADIAÇÃO UV UTILIZANDO ¹H RMN

A análise quantitativa das alterações moleculares causadas pela radiação UV nos filtros BMBM e EHMC em solução de DMSO e a comparação

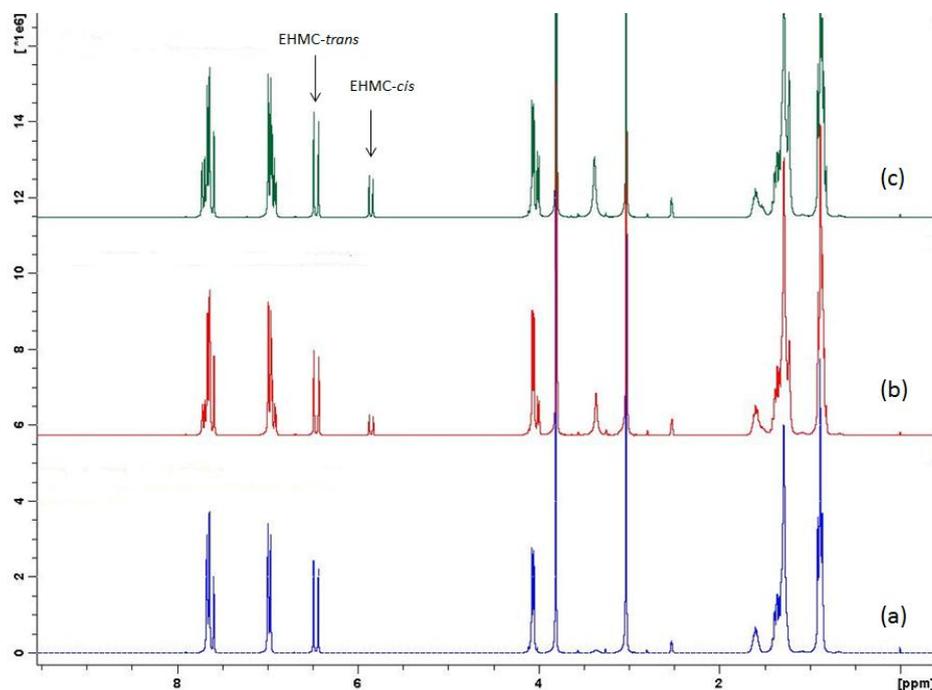
desses resultados com a adição da rutina são apresentados na **Tabela 3** e nas **Figuras 12 a 17**.

Tabela 3. Quantificação das alterações moleculares apresentadas pelos filtros BMBM e EHMC combinados ou separados, com ou sem a adição de rutina, em solução de DMSO, após exposição à radiação UV.

Soluções	Dose					
	0		3600 J cm ⁻²		5760 J cm ⁻²	
	<i>trans/cis</i>	<i>enol/ceto</i>	<i>trans/cis</i>	<i>enol/ceto</i>	<i>trans/cis</i>	<i>enol/ceto</i>
BMBM		-	-	11,7±0,1	-	10,6±0,1
EHMC	-	-	4,6±0,1	-	2,7±0,0	-
BMBM+EHMC	-	-	11,1±0,2	38,5±1,7	5,5±0,1	24,0±3,0
BMBM+rutina	-	26,7±0,2	-	9,7±0,1	-	8,8±0,1
EHMC+rutina	-	-	4,7±0,0		2,6±0,1	
BMBM+EHMC+rutina	-	15,4±0,7	22,8±0,9	13,3±0,2	12,6±0,4	13,1±0,5

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYL METHANE; **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, - = não calculado, média de três determinações ± desvio padrão.

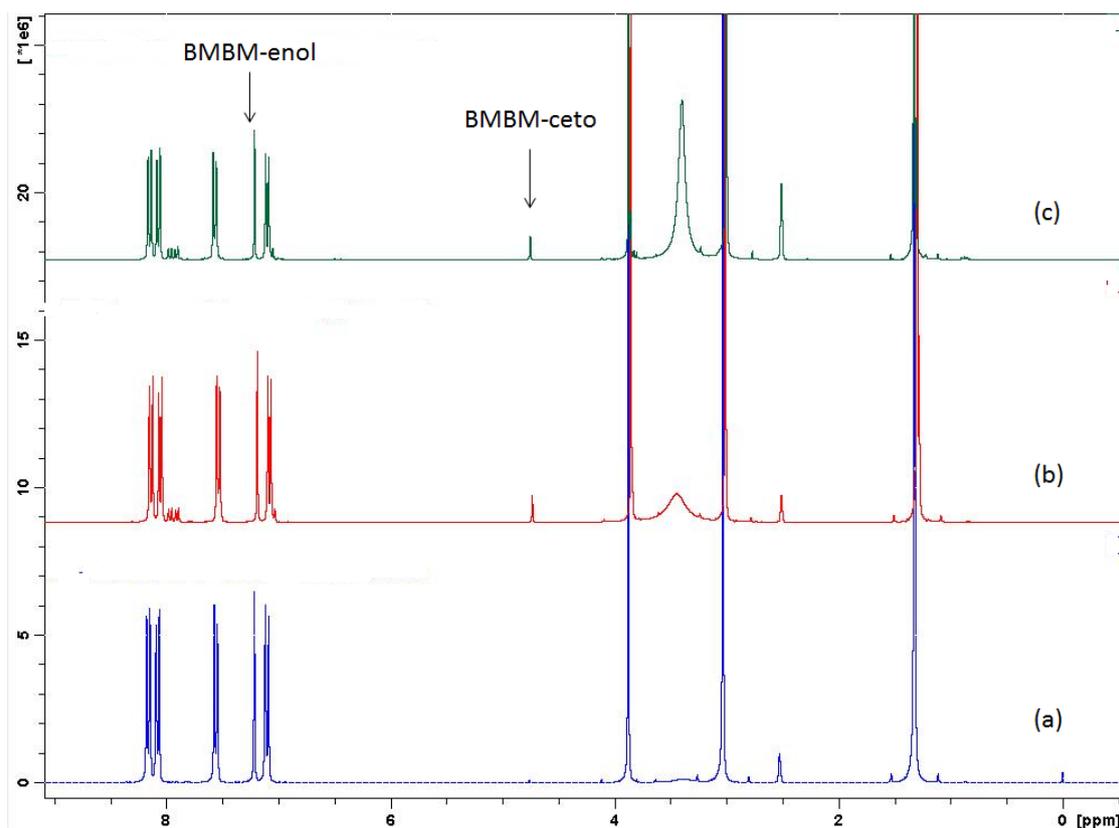
Figura 12. Espectros ¹H RMN do filtro **EHMC** antes e após irradiação UV.



Legenda: **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE, (a) = não irradiado; (b) = após dose de 3600 J cm⁻² e (c) = após dose de 5760 J cm⁻². Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas *trans* e *cis* da molécula EHMC.

Após a exposição à radiação UV, o filtro **EHMC** apresentou alterações no espectro ¹H RMN que correspondem a seu isômero *cis* e não foi detectado

nenhum outro subproduto da fotodegradação, resultado está de acordo com os resultados obtidos por Pattanargson e Linphong em 2001, que avaliaram a degradação do **EHMC** após irradiação solar natural. Selecionaram-se para a quantificação da razão *trans/cis* do **EHMC** os sinais gerados pelo hidrogênio que ocupa a posição **7**, **Figura 4**. Este sinal foi selecionado por não ocorrer sobreposição de sinais em relação ao filtro **BMBM**, e apresentar boa resolução. Na forma *trans* o sinal gerado pelo hidrogênio que ocupa a posição **7** foi observado em 6,44 ppm e sob a forma *cis* o sinal gerado foi identificado em 5,83 ppm, o que tornou possível o cálculo da razão molar entre as duas formas da molécula **EHMC**. De acordo com a **Tabela 3** e a **Figura 13**, a amostra não irradiada, inicialmente não apresentou a presença da forma *cis* para nenhuma das soluções. A partir do espectro **(b)** foi possível verificar a presença do sinal respectivo da forma *cis* da molécula **EHMC**, sendo que a razão foi alterada de $4,6 \pm 0,1$ para $2,7 \pm 0,0$ após a irradiação equivalente a 3600 e 5760 J cm⁻², respectivamente. Este resultado demonstrou que exposição à radiação UV alterou a razão *trans/cis* da molécula do filtro **EHMC**.

Figura 13. Espectros ^1H RMN do filtro **BMBM** antes e após irradiação UV.

Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, (a) = não irradiado; (b) = após dose de 3600 J cm^{-2} e (c) = após dose de 5760 J cm^{-2} . Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas enol e ceto da molécula BMBM.

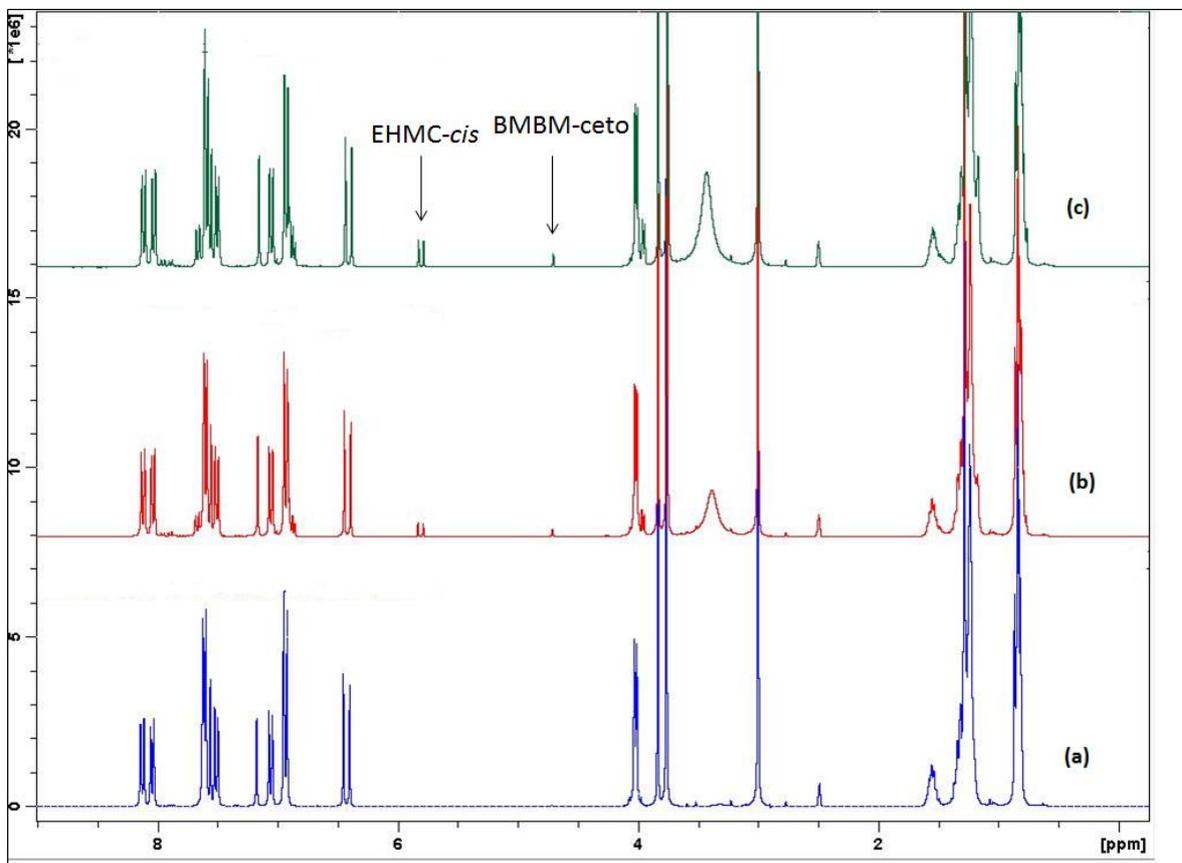
A análise do espectro ^1H RMN do filtro **BMBM** demonstrou a predominância da forma enólica da molécula do **BMBM** em solução de DMSO, **Figura 14**. Após exposição à radiação UV, a molécula apresentou alterações no espectro ^1H RMN que correspondem a seu tautômero (Mturi & Martincigh, 2008). O hidrogênio que ocupa a posição 8, **Figura 3**, na forma enólica gerou o sinal com deslocamento em 7,18 ppm, e foi selecionado para o cálculo da razão enol/ceto, sendo que na forma cetônica da molécula o sinal gerado foi observado em 4,72 ppm (Mturi & Martincigh, 2008). A integral da área para forma cetônica foi dividida por dois por apresentar dois hidrogênios na posição 8. A razão enol/ceto do BMBM, em solução de DMSO, após dose de 5760 J cm^{-2} foi $10,6 \pm 0,1$. Estes resultados são concordantes com a literatura científica (MTURI, 2005).

Observando-se a **Figura 14** que apresenta os espectros dos dois filtros **BMBM** e **EHMC**, verificamos que após a irradiação ocorreram as mesmas alterações observadas anteriormente para os filtros isolados, ou seja, a isomerização do **EHMC** e tautomerização do **BMBM**. A diferença observada foi quantitativa, sendo que após a aplicação da dose de 5760 J cm^{-2} razão *trans/cis* para o **EHMC** isolado foi de $2,7 \pm 0,0$, no entanto, para o filtro combinado com o **BMBM** ocorreu elevação da razão para $5,5 \pm 0,1$. O mesmo comportamento foi observado para o filtro **BMBM** que apresentou elevação da razão enol/ceto de $10,6 \pm 0,1$ para $24,0 \pm 3,0$, **Tabela 3**.

Na **Figura 15** estão apresentados os espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC** adicionados de rutina. A forma cetônica do filtro **BMBM** foi detectada antes da exposição da amostra à radiação UV, comportamento não observado para os filtros não adicionados de rutina. O valor da razão enol/ceto do filtro **BMBM**, após a dose de 5760 J cm^{-2} foi $13,1 \pm 0,5$; valor inferior ao calculado para mistura dos dois filtros sem adição de rutina que foi de $24,0 \pm 3,0$; mas próximo aos valores verificados para o filtro isolado ou adicionado de rutina, $10,6 \pm 0,1$ e $8,8 \pm 0,1$, respectivamente.

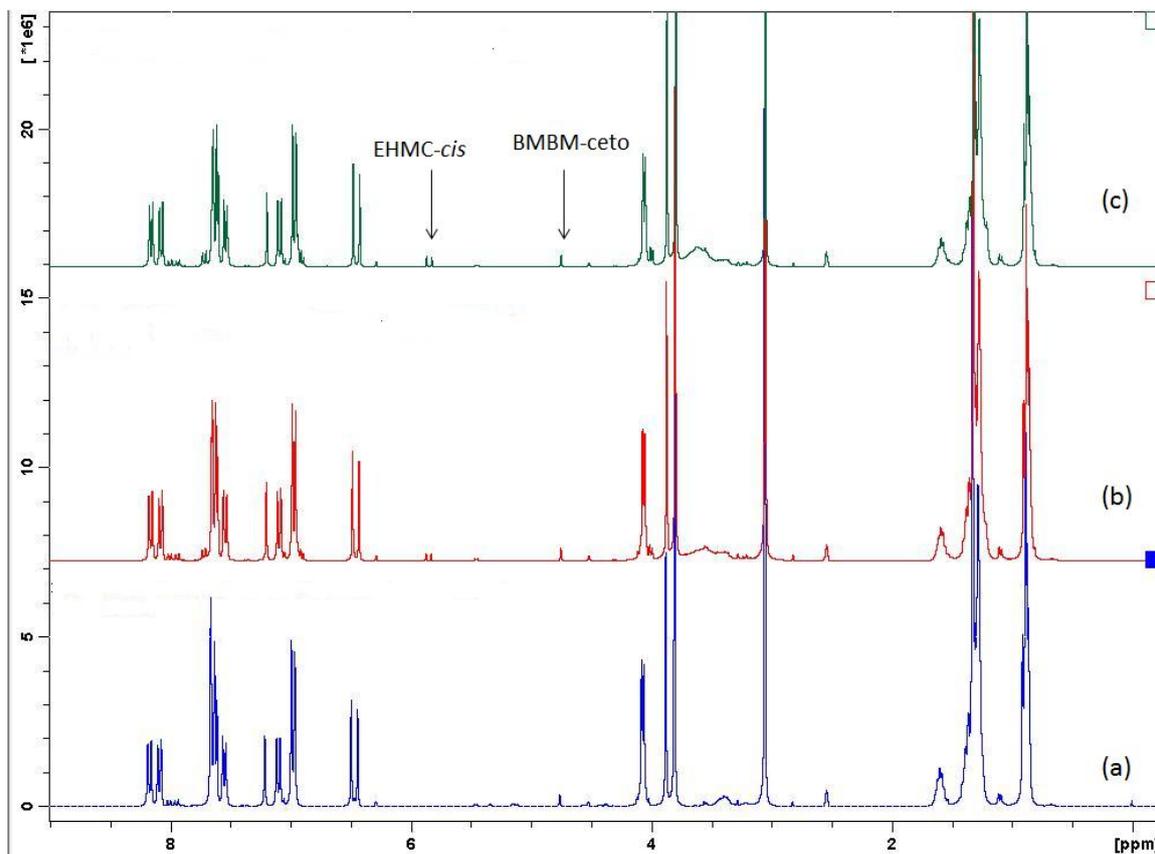
A solução contendo os filtros **BMBM** e **EHMC** adicionada de rutina também proporcionou comportamento diferenciado para o filtro **EHMC**. Após dose de 5760 J cm^{-2} a razão *trans/cis* desse filtro apresentou o valor de $12,6 \pm 0,4$; número maior que o apresentado para solução não adicionada de rutina que foi de $5,5 \pm 0,1$.

Figura 14. Espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC** antes e após irradiação UV.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (a) = não irradiado; (b) = após dose de 3600 J cm^{-2} e (c) = após dose de 5760 J cm^{-2} . Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas e ceto da molécula BMBM e *cis* da molécula EHMC

Figura 15. Espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC**, adicionados de rutina, antes e após irradiação UV.



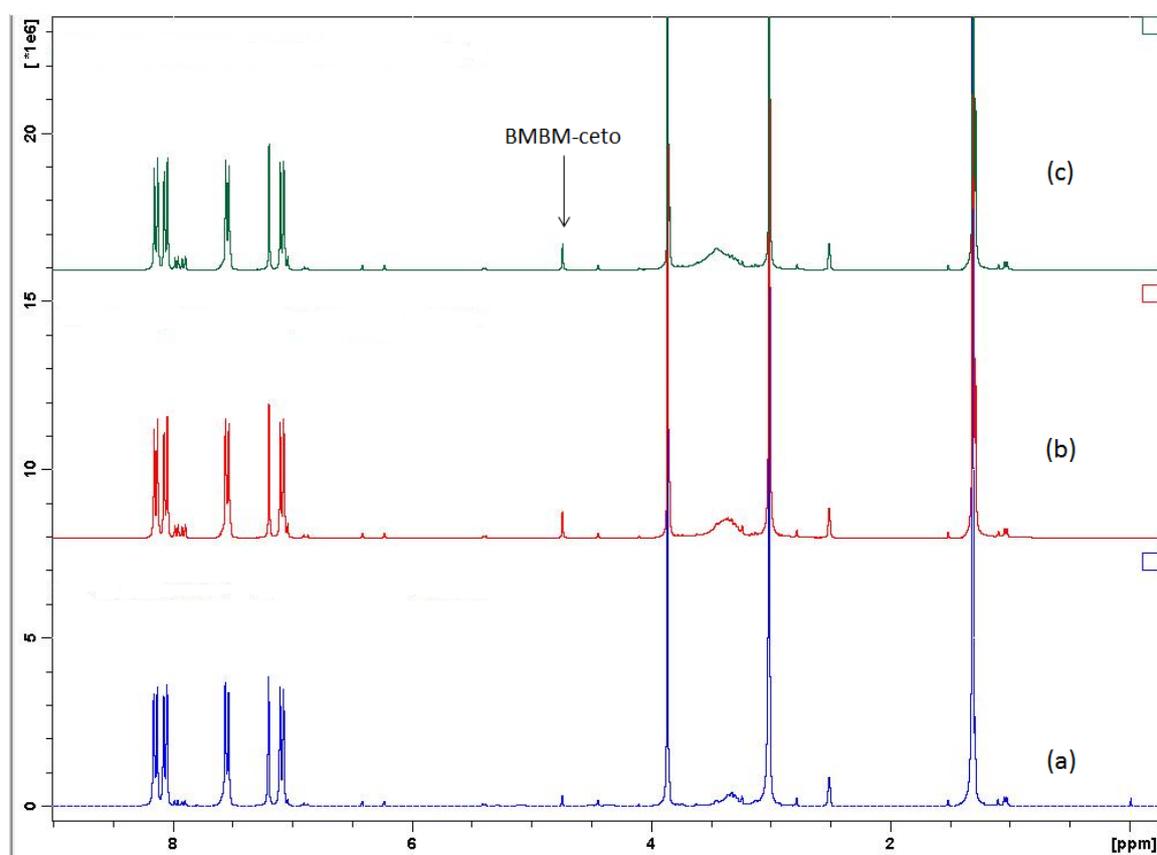
Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (a) = não irradiado; (b) = após dose de 3600 J cm⁻² e (c) = após dose de 5760 J cm⁻². Em destaque os sinais selecionados para a quantificação das formas e ceto da molécula BMBM e *cis* da molécula EHMC

Na **Figura 16** estão apresentados os espectros do filtro **BMBM** adicionado de rutina. Novamente é observado que antes da exposição à radiação, foi possível quantificar a presença da forma cetônica da molécula e calcular a razão enol/ceto. A adição da rutina promoveu alteração no comportamento da molécula mesmo antes da irradiação na presença ou ausência do filtro **EHMC**.

Após a exposição à radiação UV, a adição da rutina tanto na solução de **BMBM** quanto na de **BMBM + EHMC** não alterou este valor de maneira relevante, pois os valores apresentados após a dose 5760 J cm⁻² foram de 8,8±0,1 e 13,1±0,5, respectivamente, ao contrário do resultado observado por Mturi, 2005, que relatou que a rutina atuou na prevenção da alteração da forma

enólica para cetônica. Possivelmente, a diferença de resposta se deve a diferenças nas condições experimentais, no estudo realizado por Mturi a solução de **BMBM** adicionada de rutina, em DMSO, foi irradiada na ausência de oxigênio. No estudo divulgado, posteriormente, Mturi & Martincigh, 2008, compararam os resultados da avaliação da fotoestabilidade do **BMBM** em solução de DMSO na presença e na ausência do oxigênio e verificaram que na falta do oxigênio o **BMBM** em solução de DMSO apresentou fotoestabilidade.

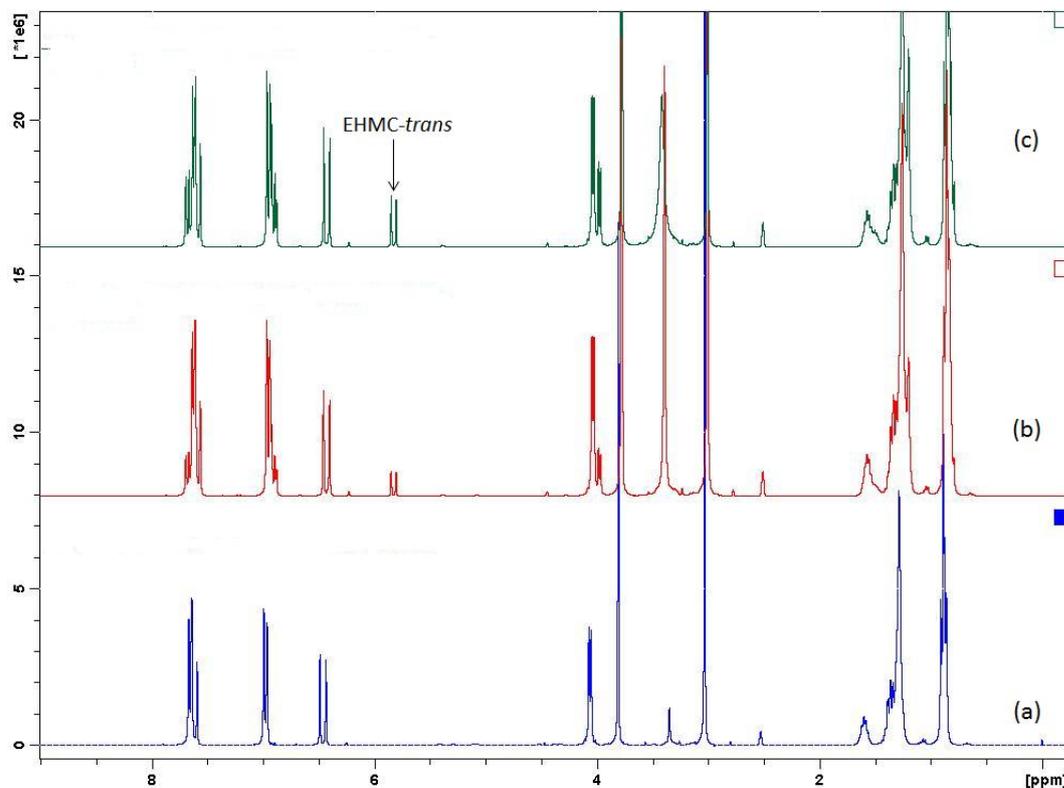
Figura 16. Espectros ^1H RMN do filtro **BMBM**, adicionado de rutina, antes e após irradiação UV.



Legenda: **BMBM** = BUTYL METHOXYDIBENZOYLMETHANE, **(a)** = não irradiado; **(b)** = após dose de 3600 J cm^{-2} e **(c)** = após dose de 5760 J cm^{-2} . Em destaque o sinal selecionado para a quantificação da forma e ceto da molécula BMBM

Na **Figura 17**, são apresentados os espectros do filtro **EHMC** adicionado de rutina, antes e após a exposição à radiação UV.

Figura 17. Espectros ^1H RMN do filtro **EHMC**, adicionado de rutina, antes e após irradiação UV.



Legenda: **EHMC** = ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE (a) = não irradiado; (b) = após dose de 3600 J cm^{-2} e (c) = após dose de 5760 J cm^{-2} . Em destaque o sinal selecionado para a quantificação da forma *cis* da molécula EHMC

A adição da rutina na solução do filtro **EHMC** isolado não alterou o comportamento do mesmo antes ou após a irradiação. Os valores da razão *trans/cis* obtidos para a solução do filtro com e sem a adição de rutina foram, respectivamente, $2,6 \pm 0,1$ e $2,7 \pm 0,0$.

As principais alterações nos espectros ^1H RMN dos filtros **BMBM** e **EHMC** foram observadas pela adição da rutina na solução que continha os dois filtros. Foi possível observar que a razão *cis/trans* do **EHMC** apresentou elevação de $5,5 \pm 0,1$ (sem adição de rutina) para $12,6 \pm 0,4$ (com adição de rutina). Observando estes resultados podemos inferir que a rutina atuou diminuindo a fotoisomerização do **EHMC** quando este estava na presença do BMBM. Este resultado foi concordante com os resultados obtidos no **Capítulo 2** desse trabalho, pois foi observado que a presença da rutina em formulações

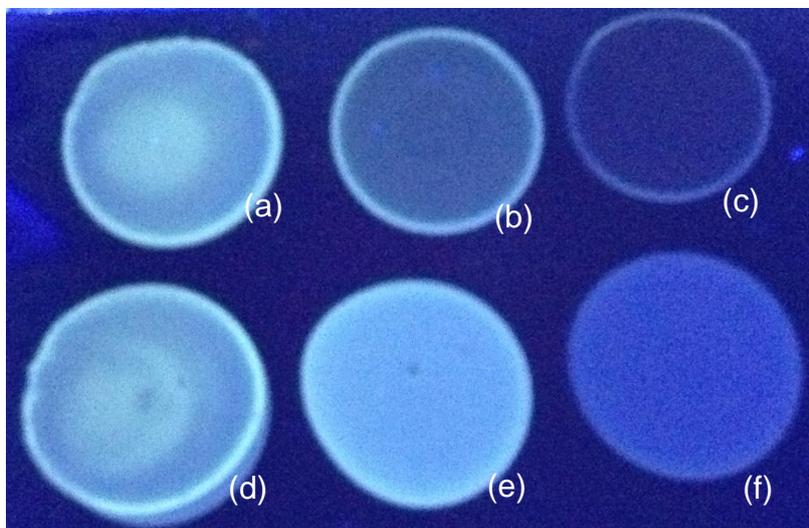
fotoprotetoras contendo os dois filtros **EHMC** e **BMBM** apresentaram maior estabilidade frente à radiação UV, avaliadas pela análise do FPS *in vitro* e λ_c . No entanto, a razão enol/ceto do filtro **BMBM** quando em solução com o filtro **EHMC** apresentou redução do valor de $24,0 \pm 3,0$ (sem rutina) para $13,1 \pm 0,5$ (com rutina), valor próximo ao observado para as soluções que não continham o **EHMC**.

5.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA SUPRESSÃO DO ESTADO DE ENERGIA SINGLETO

O processo de absorção de energia pelos filtros solares conduz a molécula ao estado excitado, que é caracterizado pela presença de energia eletrônica excitada, por exemplo, a do estado singleto ou tripleto. A análise qualitativa do estado singleto é baseada na emissão de fluorescência pelo estado excitado da molécula do filtro solar. Os filtros podem ser estabilizados por outra molécula capaz de suprimir o estado singleto e, portanto, diminuir a emissão de fluorescência (BONDA, 2009). Essa análise teve o objetivo de avaliar qualitativamente a capacidade da rutina em suprimir o estado excitado singleto dos filtros **BMBM** e **EHMC**, isolados ou combinados.

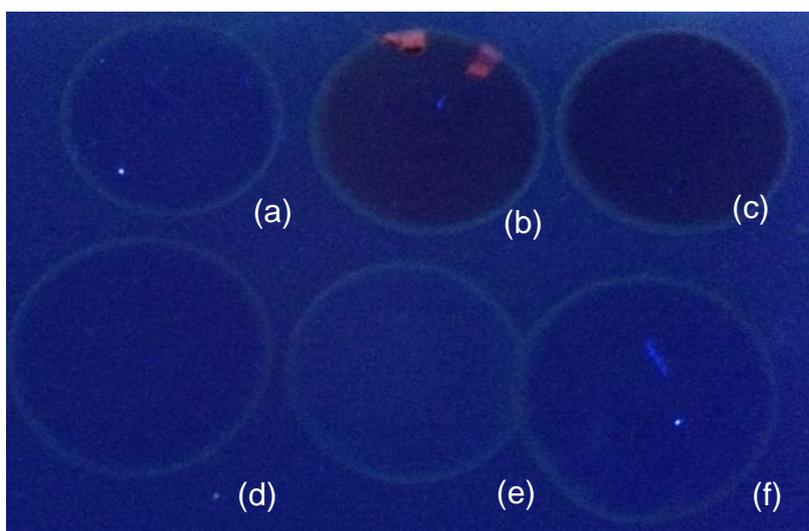
Os resultados obtidos são comparativos, sendo que nas **Figuras 18, 19 e 20** são apresentadas as imagens relativas a avaliação da capacidade de supressão do estado singleto das molécula dos filtro **BMBM** e **EHMC**, isolados ou combinados, pela rutina.

Figura 18. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro **BMBM** pela rutina.



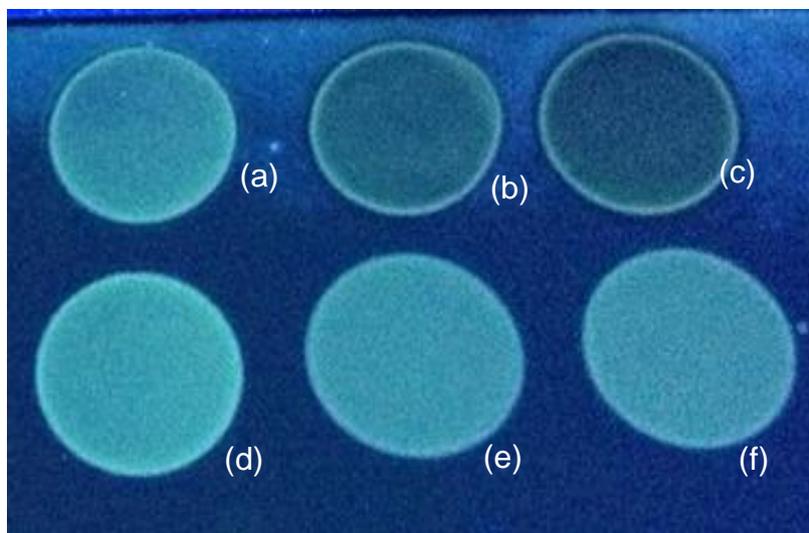
Legenda: Solução teste **BMBM** e rutina: (a) 2,0:0,0; (b) 2,0;1,0 e (c) 2,0:2,0. Solução controle negativo **BMBM** e benzoato de feniletila: (d) 2,0:0,0; (e) 2,0;1,0 e (f) 2,0:2,0.

Figura 19. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto do filtro **EHMC** pela rutina.



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

Figura 20. Avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto dos filtros **BMBM** e **EHMC** combinados pela rutina.



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

As imagens relativas da emissão de fluorescência da solução do filtro **BMBM** foram obtidas e registradas na **Figura 18**. É possível visualizar que ocorreu a supressão da fluorescência com a adição da rutina e que essa supressão foi dependente da concentração, uma vez que o escurecimento foi mais evidente na combinação da **BMBM** e rutina 2,0:2,0 em relação à amostra 2,0:1,0. Comparando-se as imagens das soluções testes com as do controle negativo foi possível verificar que as últimas (**e** e **f**) apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparadas as soluções testes (**b** e **c**). Este resultado foi atribuído à capacidade da rutina de suprimir o estado excitado singleto do **BMBM** (BONDA, 2008).

O **EHMC** não apresentou fluorescência evidente e não foi possível visualizar claramente o efeito de supressão do estado singleto exercido pela rutina, **Figura 19**. Apesar desse comportamento as soluções teste (**b** e **c**), adicionadas de rutina, apresentaram escurecimento diferenciado quando comparadas as soluções controle negativo (**e** e **f**).

A **Figura 20** apresenta a imagem do teste de supressão de fluorescência para a mistura dos filtros **BMBM** e **EHMC**, como verificado para a solução do filtro **BMBM** isolado foi possível verificar que a adição da rutina exerce supressão da fluorescência dependente da concentração, verificada pela comparação das figuras **b** e **c**, onde se verificou que a intensidade da supressão foi mais evidente para a maior concentração de rutina ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Para esta amostra, também, foi possível visualizar as diferenças entre as soluções teste e o controle negativo, fato que sugeriu a supressão do estado excitado singleto das moléculas (BONDA & ZHANG, 2011).

A transferência de energia, tanto singleto-singleto quanto tripleto-tripletto, é um importante mecanismo para a fotoestabilização de filtros solares orgânicos (SCALIA & MEZZENA, 2010; BONDA 2010). Scalia e Mezzena, 2010, sugeriram a transferência de energia tripleto-tripletto como um dos possíveis mecanismos de fotoestabilização dos filtros **BMBM** e **EHMC** pela quercetina por possuírem valores de energia do estado singleto similares. De acordo com os resultados obtidos na avaliação qualitativa da supressão do estado excitado singleto dos filtros **BMBM** e **EHMC**, verificamos que a rutina teve a capacidade de suprimir o estado singleto de energia desses filtros e podemos inferir que um dos mecanismos envolvidos na fotoestabilização pela rutina envolve a transferência de energia singleto-singleto.

6 – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As técnicas termo analíticas aplicadas para a avaliação da interação dos filtros **BMBM** e **EHMC** com a rutina demonstraram que a adição da rutina na mistura dos filtros alterou as curvas das análises DSC e TG, apresentando variação no fluxo de energia calorífica e perda de massa. A adição da rutina na mistura binária **BMBM** e **EHMC** diminuiu a temperatura inicial de perda de massa, mas não afetou a temperatura de fusão do **BMBM** e de decomposição do **EHMC**. Outra importante observação foi a alteração no comportamento da rutina frente à variação de temperatura quando combinada com os filtros isolados ou combinados. O evento endotérmico atribuído à perda de água a 153,0 °C foi mantido, mas houve modificação para o segundo evento endotérmico, observado acima de 300,0 °C. Essas alterações foram indicativas de interação entre as substâncias.

A análise quantitativa das alterações moleculares causadas pela radiação UV e monitoradas por ¹H RMN demonstraram que a adição da rutina ao filtro **BMBM** em solução de DMSO promoveu a alteração parcial para a forma cetônica da molécula mesmo antes exposição à radiação. A combinação dos filtros **BMBM** e **EHMC** adicionados de rutina apresentaram valores da razão enol/ceto e *trans/cis* diferenciados quando comparados aos calculados para a combinação não adicionada de rutina, após a exposição a 5760 J cm⁻² de radiação UV. O valor da razão *trans/cis* para o filtro **EHMC** em solução adicionado ao **BMBM** foi elevado de 5,5±0,1, (sem adição de rutina) para 12,6±0,4 (com adição da rutina). Estes resultados demonstraram que a rutina influenciou positivamente em relação a fotoestabilização do **EHMC** diminuindo a isomerização na presença do filtro **BMBM**. A razão enol/ceto do filtro **BMBM** apresentou redução do valor de 24,0±3,0 para 13,1±0,5 com a adição da rutina.

Por meio da análise qualitativa da supressão do estado singleto foi possível visualizar a supressão da fluorescência emitida pelo filtro **BMBM** e pela mistura dos dois filtros **BMBM** e **EHMC**. Esse resultado indica que um dos

mecanismos envolvidos na fotoestabilização dos filtros **BMBM** e **EHMC** pela rutina foi a transferência de energia singleto-singleto.

Avaliando-se os resultados das análises termo analíticas, que observamos importantes alterações para rutina promovidas pela adição dos filtros solares; os resultados das alterações moleculares promovidas pela radiação UV e monitoradas por ^1H RMN, que demonstraram a redução da fotoisomerização do filtro **EHMC** na presença do filtro **BMBM** e as análises qualitativas da supressão do estado singleto, que demonstraram que a rutina atuou suprimindo o estado excitado singleto do **BMBM**, sugerimos que a rutina atuou absorvendo a energia em excesso do sistema e promoveu maior estabilidade para os filtros **BMBM** e **EHMC** frente a radiação UV.

A avaliação do resultado final do trabalho indica a adição da rutina quando da mistura dos filtros solares **BMBM** e **EHMC**.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose.** São Paulo, 2007. 90p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ARAUJO, G. L. B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona.** São Paulo, 2009. 202p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BATISTA, I.A.S.A.; GONÇALVES, M.I.A.; SINGH, A.K.; HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of dimethylaminoethanol in cosmetic formulations by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v.91, n.6, p.1303-1308, 2008

BONDA, C. Research pathways to photostable sunscreens. **Cosmetics and Toiletries**, v.123, n.2, p.149-260, 2008.

BONDA, C. Sunscreen photostability 101. **Happi**, v.46, n.72, p.1-4, 2009

BONDA, C.; PAVLOVIC, A.; HANSON, K.; BARDEEN, C. Singlet quenching proves faster is better for photostability. **Cosmetics And Toiletries**, v.125, n.2, p.40-48, 2010.

BONDA, C.; ZHANG, J. Photostabilization of retinol and retinyl palmitate by ethylhexyl methoxycrylene. **Cosmetic & Toiletries**. v.126, n.1, p.40-48, 2011.

CERESOLE, R.; HAN, Y.K.; ROSASCO, M.A.; ORELLI, L.R.; SEGALL, A. Drug-excipient compatibility studies in binary mixtures of avobenzone. **Journal of Cosmetic Science**. v.64, n.5, p.317-328, 2013.

CHATELAIN E.; GABARD B. Photostabilization of Butylmethoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.3, p.401-406, 2001.

CONEAC, G.; GAFITANU, E. HADARUGA, N.; HADARUGA, D.; RIVIS, A. PÂRVU, D. Quercetin and rutin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles: obtaining, characterization and antioxidant activity. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**. v.15, n.3, p.441-448, 2009.

DARMANYAN, A.P.; LEE, W. JENKS, W. Charge transfer interactions in the generation of singlet oxygen O₂ (1Dg) by strong electron donors. **The Journal of Physical Chemistry A**. v.103, n.15, 1999.

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

DEROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v.233-234, p.351-371, 2002.

FORD, J.L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and applications**. New York: Willey-Interscience, 1986. 313p.

GONZALEZ, H. D. Photostability of sunscreen combinations containing avobenzene exposed to natural and artificial ultraviolet light. **Journal of American Academy Dermatology**, v.64, n.2, supl.1, p.AB30, 2011.

GONZALEZ, H. D.; PECHKO, A. P.; KALAFSKY, R. **Photostable sunscreen compositions and methods of stabilizing**. United States Patent, n. 6.440.402 B1, 2007.

HALLSTAR INNOVATIONS CORP. (Chicago, IL). Craig Bonda. **Test method for determining compounds capable of quenching electronic singlet state excitation of photoactive compounds**. United States Patent, n. 7776614B2, 2010.

HERZOG, B. WEHRLE, M. QUASS, K. Photostability of UV absorber systems in sunscreens. **Photochemistry and Photobiology**. v.85, n.4, p.869-878, 2009.

HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. quantitative nmr spectroscopy — applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, n.5, p.806-812, 2005. [review].

HUONG, S. P.; ROCHER, E.; FOURNERON, J.; CHARLES, L.; MONNIER, V. BUN, H. ANDRIEU, V. Photoreactivity of the sunscreen butylmethoxydibenzoylmethane (DBM) under various experimental conditions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.196, n.1, p.106-112, 2008.

KARLSSON, I.; HILLERSTROM, L.; STENFELDT, A.; MARTENSSON, J.; BORJE, A. Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens. **Chemical Research In Toxicology**, v.22, n.1, p.1881-1892, 2009.

MOYAL, D. The development of efficient sunscreens. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v.78, n.7, p.31-34, 2012.

MTURI, G. J. **An investigation of the photostabilisation of sunscreen absorbers by plant polyphenols**. KwaZulu-Natal, 2005. 393p. Dissertação de mestrado. School of Chemistry – Univerdade de KwaZulu-Natal.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B.S. Photostability of the suncreening agent 4-tert-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (avobenzene) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry**, v. 200, n.2-3, p.410-420, 2008.

PATTANAARGSON, S.; LIMPHONG, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**, v.23, n.3, p.153-160, 2001.

POOL, H.; QUINTANAR, D. FIGUEROA, J.D. MANO, C.M.; BECHARA, J.E.; GODÍNEZ, L.A. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. **Journal of nanomaterials**, v.2012, 12p. 2012.

SAYRE, R. M.; DOWDY, J.C.; GERWIG, A. J.; SHIELDS, W. J.; LLOYD, R. Unexpected Photolysis of the Sunscreen Octinoxate in the Presence of the Sunscreen Avobenzene. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, n.2, p.452-456, 2005.

SCALIA, S. MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane octyl-methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v.86, n.2, p.273-278, 2010.

SILVA, F.C.F. **Padronização de métodos analíticos para a determinação de filtros solares em emulsões**. São Paulo, 2000. 121p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

VOLLHARDT, K.P.; SCHORE, N.E. **Química orgânica, estrutura e função**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2004, 1112p.