

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

**Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil
PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia
clínica**

Letícia Costa Tomazelli Yoshida

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2017

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

**Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil
PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia
clínica**

Letícia Costa Tomazelli Yoshida

Versão Original

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo
2017

Letícia Costa Tomazelli Yoshida

Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. André Rolim Baby
Orientador / Presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

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

Tomazelli, Leticia Costa
T655f Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil
dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química,
funcional e eficácia clínica / Leticia Costa Tomazelli Yoshida. --
São Paulo, 2017.
110p.

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

1. Fator de proteção solar : cosmetologia I. T. II. Baby,
André Rolim, orientador.

668.55

CDD

Dedicatória

*Aos meus amados pais, **Carmem e Ivan**, por serem meus exemplos de amor, dedicação e cumplicidade.*

*Ao meu irmão **Matias**, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de grandes escolhas e que fez a vida mais colorida nos momentos de dificuldade.*

*À minha irmã e melhor amiga, **Mariana**, minha maior referência e exemplo a ser seguido. Por me apoiar durante todos os dias dessa jornada e caminhado lado a lado comigo quando o tempo parecia correr contra mim.*

*Ao meu grande companheiro da vida **Luiz**, que esteve comigo em cada dificuldade e em cada conquista, me apoiou em cada passo e me fez acreditar que eu era capaz de tudo que eu quisesse com a força do meu coração.*

Agradecimentos

À minha família, por nunca deixarem de acreditar em mim!

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rolim Baby, pelos ensinamentos, crescimento e valores compartilhados.

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

A Thalita, minha grande companheira de laboratório, que me apoiou em todas as etapas deste doutorado e sempre me fez olhar para frente e acreditar que era possível.

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

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

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

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

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

Muito obrigada!!!

Epígrafe

"The sun is new each day."

- Heraclitus

RESUMO

TOMAZELLI, L.C. **Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica**, 2017. 110f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A exposição crônica à radiação solar pode contribuir para o aparecimento do câncer de pele, sendo o uso de fotoprotetores um fator primordial na prevenção desses efeitos deletérios. Atualmente, substâncias bioativas tais como a rutina têm sido foco de interesse da comunidade científica graças às suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, que podem promover aumento dos valores de FPS, além de conferir características multifuncionais às formulações. Achados *in vitro* recentes indicam que a rutina, quando incorporada em emulsões fotoprotetoras óleo em água, promove aumento da atividade antioxidante e aumento do FPS. No entanto, a realização de estudos clínicos é fundamental para confirmar e quantificar esses resultados, já que a metodologia *in vitro* possui baixa repetibilidade e ausência de correlação com ensaios *in vivo*, principalmente quando as formulações analisadas apresentam substâncias antioxidantes em sua composição. O objetivo deste estudo foi avaliar pela primeira vez a atividade da rutina frente ao FPS e sua segurança clínica através da comparação de formulações fotoprotetoras contendo rutina 0.1% (w/w), avobenzona 3.0% (w/w) e octil dimetil PABA 8.0% (w/w) com uma preparação similar sem o composto bioativo. Adicionalmente, hidratação cutânea, FPS *in vitro* e atividade antioxidante *da rutina* em associação com outros filtros foram investigados. O perfil de segurança das formulações qualificou as fórmulas para os testes de eficácia clínica. O teste de DPPH confirmou a capacidade antioxidante da rutina, demonstrando cerca de 40% de aumento na capacidade de sequestro de radicais livres na presença do composto bioativo. A rutina em combinação com os filtros UV aumentou o FPS clínico de 7.30 ± 0.60 para 12.37 ± 1.13 , o que representa cerca de 70% de aumento. Os resultados encontrados provam que a rutina em combinação com outros filtros pode aumentar significativamente o valor do FPS e que a mesma é segura para uso clínico.

Palavras-chave: *Rutina. Flavonoide. Fotoprotetor bioativo. FPS. Fotoproteção. UVB. Antioxidante.*

ABSTRACT

TOMAZELLI, L.C. **Bioactive sunscreens containing rutin, octyl dimethyl PABA and avobenzone: physicochemical, functional and clinical characterization.** 2017. 110f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Unprotected chronic exposure to solar radiation can contribute to premature skin cancer and sunscreens are a key factor to avoid those detrimental effects. Currently, there is a growing interest in the photoprotector and antioxidant potential of bioactive substances, such as rutin, that could help to increase the SPF value and add multifunctional characteristics to the formulations. Recent *in vitro* findings indicated that rutin, when incorporated in oil-in-water photoprotective emulsions can provide antioxidant activity and SPF increase. However, clinical studies are fundamental to determine this activity due to *in vitro* methodology lack of repeatability and correlation between the *in vivo* data, especially when the analyzed formulas contain antioxidant substances. The aim of this study was to evaluate for the first time to date the rutin *in vivo* SPF and clinical safety by comparing sunscreens formulations containing rutin 0.1% (w/w), butyl methoxydibenzoylmethane 3.0% (w/w) and octyl dimethylPABA 8.0% (w/w) with a similar bioactive-free preparation. Additionally, skin hydration, *in vitro* SPF and *in vitro* antioxidant activity of rutin, in association with the UV filters were investigated. The safety profile of the formulations under sun-exposed skin conditions qualified the formulas for clinical efficacy assays. DPPH test confirmed rutin antioxidant properties, demonstrating about 40% increase in radical scavenging potential when the bioactive compound was present. Rutin in combination with the UV filters increased the clinical SPF from 7.30 ± 0.60 to 12.37 ± 1.13 , representing about 70% growth in the SPF value. The results obtained proved that rutin in combination with UV filters can improve the SPF value significantly and is safe for clinical use.

Key-words: *Rutin. Flavonoid. Bioactive sunscreen. SPF. Photoprotection. UVB. Antioxidant.*

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Radicais livres de oxigênio e a cadeia de reações envolvida no estresse oxidativo (PERES, 2015)	13
Figura 2: Estrutura básica de um flavonoide (PIETTA, 2000)	18
Figura 3: Representação esquemática da fórmula estrutural da rutina (BABY, 2007)	22
Figura 4: Amostras das formulações fotoprotetoras bioativas em reação com o radical livre DPPH	50
Figura 5: Gráfico da atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras bioativas	51
Figura 6: Estrutura química da rutina e grupos hidroxila responsáveis pela capacidade antioxidante da molécula (OLIVEIRA et al.,2015)	52
Figura 7: Comparativo dos valores de FPS obtidos para as formulações fotoprotetoras F1 – F8 por pares	56
Figura 8: Comparativo dos valores de lambda crítico obtidos para as formulações fotoprotetoras F3 – F8 por pares	57

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1: Equipamentos e afins utilizados nesta pesquisa	28
Quadro 2: Matérias-primas utilizadas nesta pesquisa.....	29
Quadro 3: Reagentes e solventes empregados	29

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Principais subclasses dos flavonoides (ACKER et al., 1996)	19
Tabela 2: Composição quantitativa (%w/w) e qualitativa das formulações.....	30
Tabela 3: Escala de Draize para avaliação do grau de irritação cutânea	41
Tabela 4: Características organolépticas das formulações submetidas ao estudo de estabilidade preliminar	45
Tabela 5: Características organolépticas das formulações fotoprotetoras multifuncionais F1, F2, F3 e F4	47
Tabela 6: Características organolépticas das formulações fotoprotetoras multifuncionais F5, F6, F7 e F8.....	48
Tabela 7: Análise da % de inibição de radicais livres das formulações fotoprotetoras bioativas após reação com o radical DPPH	51
Tabela 8: Valores de FPS e comprimento de onda crítico <i>in vitro</i> dos fotoprotetores multifuncionais.....	54
Tabela 9: Ensaio de segurança <i>in vivo</i> das formulações	59
Tabela 10: Fator de proteção solar (FPS) <i>in vivo</i> das formulações fotoprotetoras	61
Tabela 11: Valores de hidratação superficial da pele pelo método de corneometria	63

LISTA DE ABREVIATURAS

λ crit	-	Comprimento de onda crítico
Abs	-	Absorbância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	-	Butil hidroxi tolueno
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	-	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
cP	-	centiPoise
DEM	-	Dose Eritematógena Mínima
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEP	-	Estudo de Estabilidade Preliminar
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	-	Fator de Proteção Solar
INCI	-	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
O/A	-	Óleo em água
PABA	-	Ácido <i>p</i> -amino benzoico
pH	-	Potencial hidrogeniônico
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV	-	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Radiação ultravioleta	3
2.2. Proteção solar.....	5
2.2.1. Avaliação da eficácia fotoprotetora.....	8
2.3. Estresse oxidativo e atividade antioxidante	11
2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante.....	15
2.4. Flavonoides	17
2.4.1 Rutina	21
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Materiais	28
4.2. Preparação das formulações fotoprotetoras bioativas.....	29
4.3. Avaliação preliminar da estabilidade	32
4.3.1. Teste de centrifugação	32
4.3.2. Teste de estresse térmico.....	33
4.4. Caracterização física e fisico-química	33
4.4.1. Caracterização do pH	33
4.4.2. Caracterização física	33
4.5. Caracterização funcional <i>in vitro</i>	34
4.5.1 Determinação da atividade antioxidante	34
4.5.2. Eficácia fotoprotetora – fator de proteção solar (FPS) estimado	35
4.6. Ensaio Clínicos	36
4.6.1. Aspectos legais e éticos	37
4.6.2. Ensaio de segurança das formulações	37
4.6.2.1. Irritação cutânea primária e irritação cutânea acumulada.....	37
4.6.2.2. Sensibilização dérmica.....	38
4.6.2.3. Fotoirritação cutânea.....	39
4.6.2.4. Fotosensibilização dérmica	39
4.6.3. Eficácia das formulações	41
4.6.3.1. Fator de proteção solar (FPS).....	41

4.6.3.2. Hidratação superficial da pele	42
4.7. Análise estatística dos resultados	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Preparação das formulações	44
5.2. Avaliação preliminar da estabilidade	44
5.3. Caracterização física e fisico-química.....	46
5.4. Caracterização funcional <i>in vitro</i>	49
5.4.1. Atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras.....	49
5.4.2. Eficácia fotoprotetora estimada <i>in vitro</i>	54
5.5. Ensaio clínico	57
5.5.1. Ensaio de segurança	57
5.5.2. Ensaio de eficácia	60
5.5.2.1. Fator de proteção solar (FPS)	60
5.5.2.1. Hidratação superficial da pele	62
6. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil, sendo responsável por 30% dos casos da doença registrados no país. Apenas no ano de 2016 foram estimadas 175.760 novas incidências (INCA, 2017). Para evitar os efeitos deletérios da exposição à radiação solar, devem ser utilizadas roupas, chapéus, óculos escuros e formulações fotoprotetoras. As formulações fotoprotetoras, de uso tópico, constituem uma estratégia de proteção já estabelecida e adotada pela maior parte da população. É importante que essas formulações sejam capazes de garantir a defesa contra um amplo espectro de radiação ultravioleta. Elas podem ser compostas por filtros químicos (orgânicos), físicos (inorgânicos) ou por uma combinação dos dois. (CESTARI et al, 2012).

O desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro utilizando menores concentrações de filtros químicos aumenta a segurança clínica das formulações sob condições normais de uso (SCHLUMPF et al., 2004). Os riscos relacionados aos filtros químicos incluem a possibilidade de irritações, reações alérgicas ou até o risco de permeação cutânea. Por essas razões, há um interesse crescente pelo potencial fotoprotetor e antioxidante das chamadas substâncias bioativas, consideradas alternativas mais seguras. Sua utilização poderia aumentar o valor do FPS e adicionar características multifuncionais às formulações (KOCKLER et al., 2012). Entre os compostos naturais utilizados em formulações cosméticas, destaca-se a família de moléculas conhecida como flavonoides. O espectro de absorção de radiação UV dos flavonoides apresenta dois picos: o primeiro entre 240 e 280nm, e o segundo entre 300 e 550nm,

evidenciando seu potencial fotoprotetor (CHOQUENET et al., 2009; MATSUI et al., 2009).

A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide com significativa atividade antioxidante. Estudos recentes *in vitro* indicaram que, se incorporada a emulsões óleo-em-água contendo benzonfenona-3 e avobenzona, a 0,1% (p/p), a rutina eleva 40 vezes a atividade antioxidante da formulação. Ademais, foi obtido aumento no valor do SPF de 24 para 33, o que demonstrou haver influência da rutina, também, na proteção anti-UVB. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial fotoprotetor da rutina (SPF) *in vitro* e *in vivo*, por meio da comparação entre duas formulações: uma contendo rutina a 0,1% (p/p), avobenzona 3.0% (p/p) e octil dimetil PABA 8.0% (p/p), e outra preparação similar sem o composto bioativo (YANG et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Radiação ultravioleta

As reações causadas pela luz do sol na pele são diversas e podem ser positivas (como produção de vitamina D e liberação de endorfina) ou negativas (como envelhecimento da pele e câncer) (RADICE et al., 2016). Elas dependem, entre outros fatores, da intensidade da radiação e de seu comprimento de onda, assim como do tipo de pele de cada indivíduo. Além disso, a dose de energia recebida depende do tempo de exposição, da proximidade do sol e da comprimento de onda da radiação recebida (quanto maior o comprimento de onda, maior o grau de penetração na pele). (SCHALKA et al., 2014)

A radiação UV abrange a faixa de comprimento de onda de 100 a 400 nm e pode ser dividida em UVC (100 a 280 nm), UVB (280 a 315 nm), e UVA (315 a 400 nm). A radiação UVC é filtrada pela atmosfera e não chega a atingir a superfície terrestre. (OLIVEIRA, 2015)

A radiação UVB, apesar de compreender apenas cerca de 5% da radiação UV total que atinge a superfície terrestre, é responsável pela maioria dos eventos fotobiológicos agudos e crônicos quando absorvidos pela epiderme, tais como: distúrbios de pigmentação, eritema, degeneração das fibras elásticas, imunossupressão e fotocarcinogênese, entre outros. A radiação UVA penetra mais profundamente a pele, comprometendo gradativamente a integridade das fibras de elastina e colágeno da derme, sendo responsável pelo fotoenvelhecimento e, também, pela indução precoce de câncer (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007). Dentre os efeitos causados pela exposição à radiação UV, citam-se os danos aos lipídeos e proteínas estruturais (queratina, colágeno e

elastina) presentes na epiderme e derme; estas modificações são as principais responsáveis pelo aparecimento de rugas, sardas e perda da elasticidade, características do foto-envelhecimento cutâneo (LEVI, 2013).

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

Ainda que a eficiência do sistema antioxidante endógeno seja reconhecida, em condições adversas, incluindo exposição à radiação UV, tais defesas podem ser esgotadas, levando ao estresse oxidativo. Nestes casos, a complementação com antioxidantes de origem exógena, como os compostos bioativos, se torna de fundamental importância (CAROCHO; FERREIRA, 2013; CHEN; HU; WANG, 2012).

No Brasil, o câncer de pele é o mais frequente entre os cânceres, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Sua ocorrência está intimamente relacionada à exposição solar desprotegida, seja pela ausência de vestimentas adequadas ou não aplicação de produtos cosméticos fotoprotetores (INCA, 2015). Em termos globais o câncer de pele também representa um grande preocupação, pois sua incidência vem crescendo e a idade de incidência vem diminuindo. Além de prejudicar a saúde da população mundial, os efeitos da exposição solar excessiva também provocam um impacto negativo na economia, pois bilhões de dólares são gastos anualmente em tratamentos de câncer de pele e foto-envelhecimento. (MYDLARZ; WEBER; KUPFERMAN, 2015).

2.2. Proteção solar

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

Mas a proteção endógena da pele, embora fundamental, é insuficiente em casos de exposição excessiva à radiação UV. Por este motivo, medidas fotoprotetoras adicionais devem ser adotadas, como o uso de roupas e acessórios (chapéus, óculos escuros e guarda-sóis) para o bloqueio físico da radiação UV e, principalmente, a aplicação diária e correta de formulações fotoprotetoras, reconhecidas como a medida profilática mais eficiente no combate aos malefícios causados por essa radiação (CESTARI; OLIVEIRA; BOZA, 2012).

A conscientização da população mundial quanto aos efeitos deletérios da radiação solar vem aumentando e desencadeando a pesquisa por medidas efetivas de fotoproteção. Este fato, alinhado às inovações propostas pela Indústria Cosmética, tornou o uso de protetores solares parte integrante do dia-a-dia de grande parte da população, seja em sua forma tradicional ou associado a produtos cosméticos diversos, como maquiagens e hidratantes (TANNER, 2006).

Os filtros ultravioleta (filtros UV) são os ingredientes presentes nas formulações fotoprotetoras e que apresentam a capacidade de interagir com a radiação incidente através de 3 mecanismos básicos: reflexão, dispersão e absorção. Podem ser divididos em físicos (inorgânicos) ou químicos (orgânicos). (SCHALKA; REIS, 2011)

Os filtros inorgânicos são partículas de óxidos metálicos capazes de refletir ou dispersar a radiação incidente. Suas principais qualidades são a baixa permeação cutânea e a elevada foto-estabilidade, ou seja, sua capacidade de manter a capacidade fotoprotetora mesmo após longos períodos de radiação solar (SCHALKA; REIS, 2011). Estes compostos encontram-se dispersos nas formulações e são os principais responsáveis pela opacidade e coloração branca dos fotoprotetores. Por esse motivo a sua aceitação cosmética é baixa. (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Os filtros químicos são compostos essencialmente 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). Para ação fotoprotetora efetiva, atualmente, são associados pelo menos dois tipos de filtros químicos, objetivando ampliar a absorção da radiação UV nos intervalos UVB e UVA (MAIER *et al.*, 2001; BERNEBURG *et al.*, 1999; SHAATH, 1997; GIOKAS; SALVADOR; CHISVERT, 2007).

O desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro, utilizando concentrações reduzidas de filtros químicos, favorece a segurança clínica das formulações nas condições normais e previsíveis de uso. Tal tendência é ocasionada pelo risco de reações alérgicas ou irritativas e pela possibilidade de

permeação cutânea dos compostos ativos. (SCHLUMPF *et al.*, 2004; MAIER; KORTING, 2005).

Embora diversas moléculas possuam características promissoras, efeitos como a permeação cutânea, segurança, foto-instabilidade e aceitabilidade cosmética de determinados filtros ainda impedem seu uso em formulações cosméticas, seja na forma isolada ou em associação com demais compostos (KOCKLER *et al.*, 2012).

Visando contornar os efeitos responsáveis por diminuir a adesão dos consumidores ao uso diário de fotoprotetores, novas abordagens tem aparecido no desenvolvimento das formulações, com destaque para o uso de substâncias naturais, o emprego da nanotecnologia e a síntese de novos filtros orgânicos (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Pesquisas nessa área desenvolvem moléculas novas ou descobrem potenciais de uso para substâncias não utilizadas tradicionalmente para esta finalidade (SCHLUMPF *et al.*, 2004; MAIER; KORTING, 2005).

A legislação norte-americana (FDA) classifica os protetores solares como medicamentos não prescritivos e relaciona 16 substâncias aprovadas como filtros UV, bem como suas concentrações máximas permitidas em formulações fotoprotetoras. (UNITED STATES, 2016)

No Brasil, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quem classifica os protetores solares como produtos cosméticos e apresenta a relação de filtros ultravioleta permitidos, contendo ao todo 38 ingredientes ativos (Tabela 1) (BRASIL, 2016).

É importante ressaltar que apesar de alguns estudos terem demonstrado os efeitos negativos dos fotoprotetores (como casos de dermatite de contato, absorção

sistêmica e alterações na síntese de vitamina D), há consenso de que os seus benefícios superam os inconvenientes e, portanto, seu uso deve ser amplamente incentivado por políticas de saúde pública. (LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007; SCHALKA et al., 2014).

2.2.1. Avaliação da eficácia fotoprotetora

É possível dividir os métodos de avaliação de eficácia fotoprotetora em dois grandes grupos:

- Métodos *in vivo*: métodos que avaliam um “*end point*” biológico (o estágio final após uma reação biológica estar completa) causado pela radiação solar, verificando a capacidade da formulação de impedir ou adiar o evento. Pode ser considerado um método ideal caso o evento biológico observado seja relevante, de fácil observação e com medições de alta reprodutibilidade e repetibilidade.
- Métodos *in vitro*: utilizando culturas celulares ou reagentes específicos, os métodos *in vitro* são uma alternativa para avaliar alterações moleculares ou celulares provocadas por radiação solar em condições específicas. São por vezes associados ao uso de espectrofotometria, devido à capacidade dos filtros de refletirem ou absorverem radiação. (SCHALKA et al., 2014)

A quantificação da eficácia de uma formulação fotoprotetora depende da definição de qual efeito da radiação se quer evitar. A primeira metodologia a ser desenvolvida e validada para medir a eficácia de um protetor solar foi o FPS (Fator de Proteção Solar, ou SPF na sigla em inglês). O FPS é uma metodologia que quantifica a proteção oferecida contra o eritema (queimadura de sol). (SCHALKA; REIS, 2011)

O valor do FPS consiste na razão entre a dose eritematogênica mínima (DEM) para a pele protegida e a DEM para a pele não-protegida. A DEM é definida como a quantidade de energia emitida por um simulador solar UV (expressa em Joules/cm²) requerida para a produção da primeira reação eritematogênica perceptível e com bordas claramente definidas.

$$FSP = DEM \text{ (pele protegida)} / DEM \text{ (pele não-protegida)}$$

O espectro gerado pelo simulador solar UV deve ser filtrado para propiciar emissão no intervalo de 290 a 400 nm (ou seja, radiações UVB e UVA), com limite de 1500 W/m². Como o eritema é uma reação causada principalmente pela radiação UVB, o FPS não é considerado um teste adequado para avaliar o efeito da radiação UVA.

É preciso ressaltar que apesar da metodologia para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) dessas formulações ter sido validada e publicada na literatura, esse valor não representa a proteção real fornecida aos usuários. Diversos estudos demonstraram que há significativas diferenças entre os resultados obtidos em laboratório e a performance dos protetores solares na prática, principalmente devido à diferença na quantidade de produto aplicada.

Os usuários aplicam geralmente apenas 30-50% da quantidade recomendada de produto (2mg/cm²), causando uma redução exponencial no valor do FPS obtido. (SCHALKA et al., 2014)

Dessa forma, apesar do Fator de Proteção Solar ser ainda considerado a principal informação acerca da eficácia fotoprotetora de um filtro solar, sua interpretação não deve ser baseada somente no valor numérico em si, devendo-

se também considerar a adequada forma de uso do produto, em termos de quantidade aplicada e regularidade na reaplicação. Além disso, na escolha de um agente fotoprotetor devem ser levados em consideração os dados relativos à substantividade (resistência à água), proteção UVA e fotoestabilidade. (SCHALKA; REIS, 2011)

O principal parâmetro para avaliar o nível de proteção contra radiação UVA é o UVA-PF (ou PPD, *Persistent Pigment Darkening*). O UVA-PF possui metodologias validadas *in vivo* ou *in vitro*. De forma análoga ao SPF, no ensaio PPD mede-se a energia necessária para causar pigmentação visível na pele de voluntários expostos à radiação UVA (chamada dose mínima de pigmentação persistente, ou MPD na sigla em inglês).

O melhor parâmetro para avaliar a proteção que uma formulação fornece em amplo espectro é o comprimento de onda crítico. Esse parâmetro deve ser definido com a utilização da técnica de espectrofotometria, a partir da curva espectral da formulação para irradiação no intervalo de 290-400nm. O comprimento de onda crítico é o valor para o qual a área integrada sob a curva corresponde a 90% da área total entre 290 e 400nm. (SCHALKA et al., 2014, OLIVEIRA, 2015)

As análises *in vivo* preconizadas pelos órgãos de referência internacionais (FDA, COLINA) são empregadas e aceitas por diversos países, mas são complexas e de custo elevado, pelo fato de envolverem tecnologia onerosa, contratação de técnicos especializados e emprego de voluntários humanos. Geralmente são utilizadas apenas na etapa final do desenvolvimento das formulações fotoprotetoras. Durante o processo de desenvolvimento são priorizados os métodos *in vitro*, cujas principais vantagens são: diminuição do

risco (não expõe voluntários), rapidez de execução, custo acessível, reprodutibilidade, facilidade para treinar operador. (TANNER, 2006; PEDRIALI, 2012)

A Legislação Brasileira considera que uma formulação pode ser classificada como fotoprotetora apenas se apresentar FPS acima de 6, com comprimento de onda crítico acima de 370 nm, e UVA-PF equivalente a, no mínimo, 1/3 do FPS (BRASIL, 2012).

2.3. Estresse oxidativo e atividade antioxidante

Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons livres desemparelhados, o que os torna extremamente instáveis e propensos a reagir com outros compostos. Podem ser formados a partir do oxigênio (EROs – Espécie Reativa de Oxigênio), nitrogênio (ERNs) e enxofre (EREs). No corpo humano podem ser produzidos por via endógena (mitocondrial) ou exógena. Entre os fatores que promovem a formação de radicais livres por via exógena, destacam-se a radiação UV, o ozônio, a poluição, os solventes industriais, o fumo. (CAROCHO; FERREIRA, 2013)

O equilíbrio entre a produção e a neutralização dos EROs pelos antioxidantes é bastante delicado. Quando a produção dessas espécies é considerada excessiva, as células sofrem o que se chama de estresse oxidativo. (CAROCHO; FERREIRA, 2013)

Entre os efeitos do estresse oxidativo estão a peroxidação dos lipídios de membrana e a agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, o excesso de radicais livres encontra-se relacionado com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico,

doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Também está diretamente relacionado ao fotoenvelhecimento. (CHEN; HU; WANG, 2012)

O radical hidroxila é o mais deletério dos radicais livres ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado in vivo. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Nos experimentos de laboratório a hidroxila pode facilmente ser seqüestrada in vitro por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados in vitro se reproduzam in vivo, é necessário ministrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical hidroxila está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

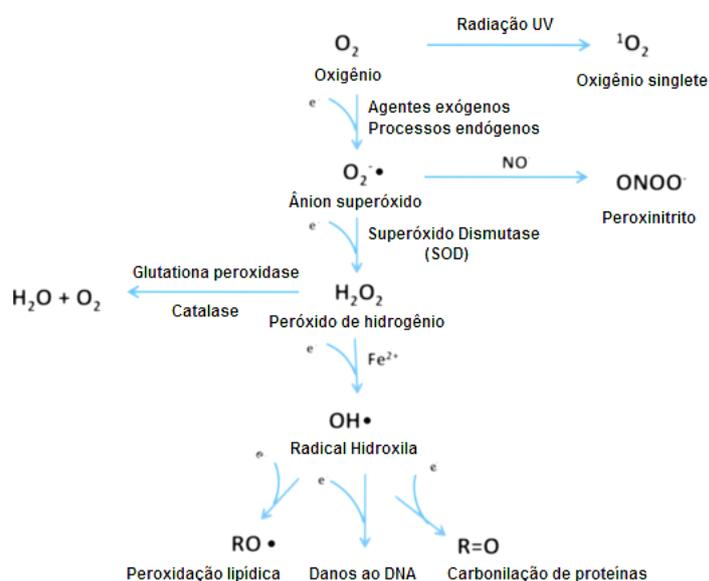
O radical hidroxila é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H₂O₂ com metais de transição (como a reação de Fenton) e homólise da água por exposição à radiação ionizante (a incidência de radiação no ultravioleta pode produzir o radical nas células da pele). O ataque intensivo e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O organismo humano apresenta defesas próprias (ditas endógenas) para combater o estresse oxidativo provocado pelos radicais livres. Essas defesas podem ser classificadas em enzimáticas e não enzimáticas (ou micromoleculares). Dentre as principais enzimas, tem-se a glutathione peroxidase e a catalase, responsáveis pela eliminação de peróxido de hidrogênio; e a superóxido dismutase, responsável pela conversão do ânion superóxido em

peróxido de hidrogênio, para posterior degradação pelo sistema catalase-superóxido dismutase. (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Dentre as defesas não enzimáticas, citam-se compostos antioxidantes produzidos pelo organismo, como a vitamina A e a coenzima Q10. Apesar da eficiência das defesas endógenas, elas muitas vezes não são suficientes para combater o excesso de radicais livres. Nesses casos a complementação pode ser feita através da ingestão de alimentos ou da aplicação tópica de produtos ricos em antioxidantes. Entre esses antioxidantes que podem ser obtidos de forma exógena, destacam-se as vitaminas C e E (CAROCHO; FERREIRA, 2013. CHEN; HU; WANG, 2012; KOHEN, 1999; MASAKI, 2010).

Figura 1: Radicais livres de oxigênio e a cadeia de reações envolvida no estresse oxidativo (PERES, 2015)



A utilização dos protetores solares tradicionais, mesmo quando aplicados de maneira adequada, não é suficiente para prevenção contra o estresse oxidativo causado pelos radicais livres gerados pela radiação UV (ZHANG *et al.*, 2010). Haywood e colaboradores (2003) demonstraram, por espectroscopia do

spin eletrônico de excisados de pele obtidos por cirurgia plástica, que protetores solares, ainda que apresentassem amplo espectro de proteção, reduziram a formação de radicais livres em apenas 55%, após exposição dos estratos de pele à radiação UV artificial. Por este motivo, uma alternativa para o aumento da concentração de antioxidantes na pele é a administração tópica, que permite o aumento do tempo de meia vida das moléculas, protegendo a pele de forma mais efetiva dos malefícios da radiação UV. (HAYWOOD et al., 2003)

A combinação de antioxidantes com filtros solares se apresenta promissora porque os compostos agiriam de forma sinérgica, por mecanismos diferentes e complementares (ou seja, constituiriam formulações multifuncionais): enquanto os filtros atuariam na superfície da pele, absorvendo ou refletindo a radiação UV, os antioxidantes poderiam atuar tanto na superfície (absorvendo radiação UV) quanto em camadas mais profundas da derme e epiderme (combatendo o estresse oxidativo), fornecendo, portanto, proteção solar muito mais completa (PERES, 2015).

Antioxidantes sintéticos, especialmente as moléculas BHA e BHT, foram desenvolvidos visando especialmente a indústria alimentícia. Esses compostos são adicionados a quase todos os tipos de alimentos processados, a fim de conservar suas propriedades e aumentar sua “tempo de prateleira”. Porém, estudos realizados a respeito da segurança desses compostos são contraditórios, o que aumenta o interesse no potencial antioxidante de compostos naturais (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Pelo fato de diversos antioxidantes naturais já fazerem parte da dieta humana, eles e seus metabólitos raramente provocam reações alérgicas ou irritativas. (STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014)

Entre os grupos bioativos que tem sido intensamente estudados para acrescentar proteção antioxidante aos filtros UV, destacam-se os compostos fenólicos, polifenólicos e flavonoides. Atualmente considera-se que a melhor abordagem na proteção contra radiação solar inclui filtros UV, com utilização tópica de antioxidantes em suas fórmulas e inclusão de compostos antioxidantes na dieta.

Contudo, apesar do grande potencial da combinação de antioxidantes com filtros solares, diversas questões de caráter técnico precisam ainda ser resolvidas. É necessário que os antioxidantes estejam presentes na formulação final de forma estável, em alta concentração e com alto nível de atividade antioxidante. Além disso, a formulação idealmente deve permitir que os antioxidantes penetrem na pele até um certo grau, ao mesmo tempo que evita a penetração dos filtros solares. E por fim, há requisitos cosméticos, que podem dificultar a utilização de alguns compostos em função de sua coloração. (CHEN; HU; WANG, 2012; WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010).

2.3.1. Avaliação da atividade antioxidante

Existem hoje diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de uma substância, cada um com seu respectivo mecanismo de ação, vantagens e desvantagens. Para a seleção do método antioxidante ideal, alguns fatores devem ser avaliados, como a função do antioxidante na formulação (inibir radicais livres, por exemplo); a localização do antioxidante no sistema em avaliação (fase aquosa ou oleosa); e os possíveis interferentes (substâncias na

matriz da formulação com absorção próxima ao comprimento de onda de análise, por exemplo). (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

A técnica de *tape stripping*, que permite a obtenção e estudo do estrato córneo da pele, se apresenta como metodologia promissora. O estrato córneo representa a parte mais externa e a principal barreira da pele, controlando a entrada de substâncias externas ou a excreção de substâncias endógenas. Dessa forma, muitos estudos dermatológicos são focados no estudo dessa camada, inclusive estudos voltados ao desempenho de protetores solares. (ALONSO *et al.*, 2009; LADEMANN *et al.*, 2009).

O *tape stripping* consiste na aplicação tópica de formulações em voluntários, seguida de sucessiva remoção das camadas de células do estrato córneo, a partir da mesma área de pele, utilizando fitas adesivas. Sabendo-se que substâncias de uso tópico atingem a epiderme e a derme após a sua distribuição pelo estrato córneo, é possível correlacionar a concentração da substância retida na camada córnea com a capacidade de penetração dos compostos (LADEMANN *et al.*, 2009; SHAH; GLYNN; YACOBI, 1998).

O método de aplicação das formulações, a pressão exercida pelo avaliador no momento em aplicar as fitas na pele do voluntário e a rapidez com que as fitas são removidas são algumas das variáveis extrínsecas que podem influenciar no resultado da análise, e deve-se procurar padronizá-las quando possível. As características individuais da pele dos voluntários, assim como a disposição dos corneócitos (maior ou menor coesão entre eles) e o grau de hidratação cutâneo apresentam-se como variáveis intrínsecas (LADEMANN *et al.*, 2009).

Entre as vantagens do *tape stripping*, destaca-se o fato de ser uma técnica simples, pouco invasiva, e que provoca desconforto mínimo aos voluntários. Pode ser associada à uma metodologia *in vitro* para avaliação de atividade antioxidante, submetendo apenas o estrato córneo removido nas fitas à irradiação UV (ALONSO et al., 2009). Dessa forma, reduz-se a exposição dos voluntários à irradiação.

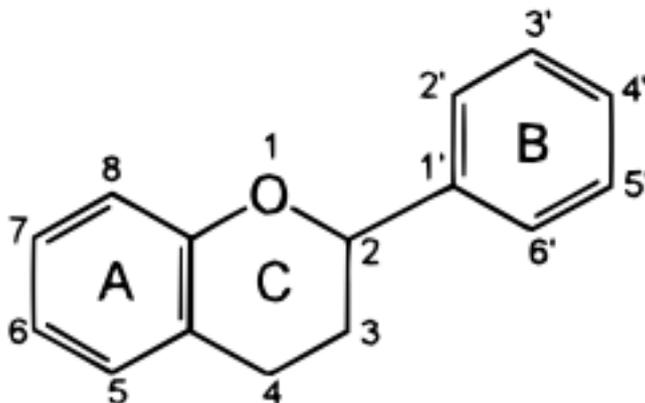
2.4. Flavonoides

Polifenóis de origem vegetal são uma conhecida classe de poderosos antioxidantes. Esses compostos podem ser encontrados virtualmente em todos os alimentos de origem vegetal, frequentemente em alta concentração, e incluem fenóis, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e lignanas (PIETTA, 2000).

Os flavonoides são encontrados em uma variedade de espécies vegetais e apresentam uma rica diversidade estrutural, sendo que mais de oito mil flavonoides já foram caracterizados. Flavonoides e seus glicosídeos atuam nos vegetais como antioxidantes hidrofílicos, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visuais, catalisadores, e como filtros da radiação UV, além de atuarem como substrato na proteção dos tecidos após agressão física (HAN et al, 2012; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

A estrutura química básica de um flavonoide consiste em três anéis formados por 15 átomos de carbono, sendo dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (C₆C₃C₆). (PIETTA, 2000; ALVES et al., 2007; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Figura 2: Estrutura básica de um flavonoide (PIETTA, 2000)



Há variedade enorme de flavonoides descobertos e estudados em extratos vegetais. Essa variedade se deve ao fato de que a estrutura básica dos flavonoides pode sofrer modificações químicas, como: hidroxilação, metilação e glicosilação, entre outras. Os flavonoides são subdivididos em classes de acordo com o nível de oxidação e os substituintes no anel C (figura 2). Os flavonoides são importantes componentes da dieta humana, e no corpo humano possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antineoplásica, antiulcerosa, anti-inflamatória, inibitória enzimática e antialérgica, entre outras (ALVES et al., 2007; BEHLING et al., 2004; DORNAS et al., 2008; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; LOPES et al., 2000, PIETTA, 2000).

Tabela 1: Principais subclasses dos flavonoides (ACKER et al.,1996)

Sub-classes	Cor	Flavonoides representativos	Fontes alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavanol	Incolor e amarelo	Catequinas, epicatequinas, procianidina	Macãs, chá, cerveja, sucos de uva e vinho
Flavanona	Incolor e amarelo	Hesperidina, Naringenina	Frutas Cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, Luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Miricetina, quercetina e rutina	Cebolas, macãs, chá, tomates, trigo, sarraceno
Isoflavona	Incolor	Genisteína, Dizeína	Legumes (derivados da soja)

De modo geral, os flavonoides possuem uma estrutura que favorece o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. Essa atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas, sendo que quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Flavonoides com potencial de oxidação menor que o do Fe^{+3} e Cu^{+2} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente prooxidantes, tendo em vista que o Fe^{+2} e o Cu^{+} participam da reação de Fenton geradora de radicais livres. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HAN et al., 2012)

O último fator importante que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides é a sua interação com as biomembranas. A lipofilicidade do flavonóide indica a incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Flavonoides que possuem uma cadeia de açúcares ligada em sua estrutura são muito polares, não sendo assimilados pela membrana, porém, nesta forma eles podem ser armazenados em vesículas, possuindo um tempo maior de permanência no organismo. Os flavonoides que são assimilados pelas membranas exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez os flavonóides geram um impedimento físico para a difusão das ERO e ERN, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Muitos compostos polifenólicos naturais são pigmentados (tipicamente amarelos, vermelhos ou roxos) e absorvem radiação UV. (NICHOLS; KATYIAR, 2010) De forma geral, o espectro de absorção UV dos flavonoides gera dois picos máximos de absorção, sendo um deles entre 240 e 280 nm e o outro entre 300 e 550 nm, evidenciando a possibilidade do emprego de flavonoides como moléculas

fotoprotetoras em potencial (BOBIN et al., 1995; SOUZA et al., 2005; VIOLANTE et al., 2008; STEVENATO; BERTELLE; FABRIS, 2014).

2.4.1. Rutina

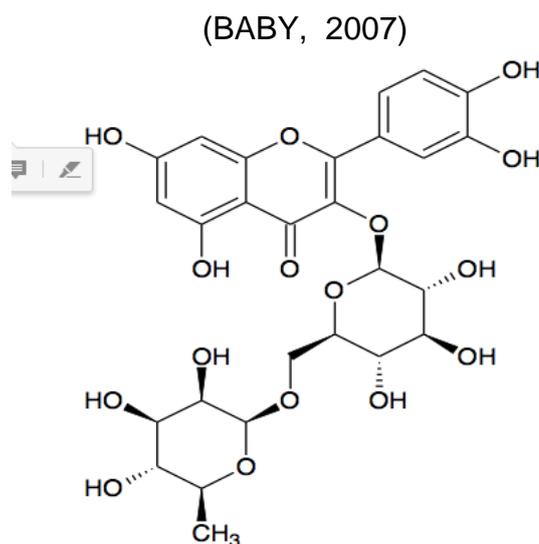
A rutina (3-*o*-rutinosídeo-quercetina) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis. Entre os alimentos que possuem rutina podemos citar as frutas, o trigo sarraceno e algumas bebidas derivadas de vegetais, como vinho e chá verde. Devido à sua intensa atividade antioxidante, a rutina é utilizada na indústria alimentícia, na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, além de ser empregada na prevenção aos danos causados pela radiação UV. (GUARDIA et al., 2001; YANG et al., 2007; VELASCO et al., 2008a; BABY et al., 2008). Diversos estudos também indicam que a rutina pode ser útil no combate a certos tipos de câncer (pulmonar, hepático, leucemia, entre outros). (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

No Brasil, a rutina é extraída da fava d'anta (*Dimorphandra mollis Benth*), uma espécie arbórea, de ampla adaptação aos terrenos secos do cerrado nos estados do Pará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina. A maior parte da produção é destinada ao mercado externo. A produção de rutina a partir de fava d'anta correspondia, em 2000, a cerca de 50% da produção mundial. (GOMES; GOMES, 2000.)

A rutina possui massa molar de 610,5175 g/mol e apresenta quatro constantes de dissociação, correspondentes à desprotonação das hidroxilas nas posições: 4'-OH; 7-OH; 3'-OH, 5-OH, em ordem de ocorrência de perda de H⁺, conforme variação do valor de pH do meio (PIETTA, 2000). Os valores de pKa, que descrevem a capacidade relativa para cada centro ácido de ionização da molécula,

variam de acordo com a literatura. Segundo Mielczarek, 2005, as constantes de dissociação da rutina apresentam os seguintes valores: $pK_1 = 7,35 \pm 0,02$; $pK_2 = 8,8 \pm 0,10$; $pK_3 = 11,04 \pm 0,10$; $pK_4 = 11,9 \pm 0,10$ (MIELCZAREK, 2005; HOWARD; WENDER, 1952).

Figura 3: Representação esquemática da fórmula estrutural da rutina



Quanto à sua solubilidade, a rutina apresenta baixa solubilidade em água (0,125 g/L) e em meios lipofílicos, sendo seu log P aproximadamente 0,64. Tal evidência dificulta a permeação do flavonoide através de membranas biológicas e diminui sua biodisponibilidade, limitando certas aplicações. (BALDISSEROTTO et al., 2015; BABY, 2007).

O uso da rutina livre é adequado em filtros solares considerando sua capacidade de absorção de radiação e sua atividade antioxidante voltada para o sequestro de radicais livres formados na superfície da pele pela ação da radiação ultravioleta. Para maximizar sua ação antioxidante nas camadas mais profundas, entretanto, é necessário melhorar sua permeabilidade cutânea. Nesse sentido,

diversos estudos recentes tem testado formas alternativas de incorporar a rutina nas formulações. (BALDISSEROTTO et al., 2015; BABY, 2007).

Alguns pesquisadores desenvolveram substâncias derivadas da rutina, buscando conservar as propriedades de antioxidante, mas com solubilidade (aquosa ou lipídica) superior. (PEDRIALI, 2012; BALDISSEROTTO et al., 2015). Outros estão estudando a utilização da rutina através de sistemas particulados de gelatina ou carreadores lipídicos nano-estruturados (KAMEL et al., 2015; OLIVEIRA, 2015)

O alto potencial antioxidante da rutina é atribuído a três mecanismos distintos: os dois grupamentos hidroxilas em configuração orto no anel B (figura 2), que conferem estabilidade ao radical formado; a dupla ligação C2-C3 conjugada com a função 4-oxo no anel C, responsável pela deslocalização eletrônica do anel B e a presença de hidroxilas nas posições 7 e 5 do anel A (LUE et al., 2010; YANG et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015).

A avaliação da capacidade antioxidante dos flavonoides já foi feita por diversos estudos (ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998; YANG et al., 2008. HAN; ZHANG; SKIBSTED, 2012; NICHOLS; KATYIAR, 2010). Yang e colaboradores compararam a capacidade antioxidante da rutina com o ácido ascórbico e com o BHT (hidroxitolueno butilado, um conhecido antioxidante utilizado comercialmente). Ensaio in vitro indicaram que a atividade antioxidante da rutina foi menor do que a do ácido ascórbico nos ensaios com DPPH•, mas em termos de peroxidação lipídica a rutina obteve resultado superior às duas outras substâncias (YANG et al., 2008).

Afim de compreender melhor a relação entre a estrutura química da rutina e sua atividade antioxidante, Lue e colaboradores, 2010, compararam a

atividade antioxidante da rutina à de dois de seus ésteres (possuindo grupamentos acila nos carbonos C12 e C16) e ao BHT. Foi constatado que, in vitro, os ésteres estudados apresentaram poder redutor e habilidade quelante de metais inferiores aos apresentados pela rutina, porém, semelhante atividade sequestradora do radical livre DPPH•. (LUE et al., 2010) A capacidade quelante da rutina e de outros flavonoides se deve primordialmente à presença de grupamento catecol, conforme indicado por Cherrak e colaboradores, 2016 (CHERRAK et al., 2016).

A rutina apresenta duas faixas de absorção na faixa do espectro ultravioleta: a faixa I, de comprimentos de onda entre 320 e 385 (UVA) e a faixa II, compreendendo a banda de 250 a 285 (UVB). A absorção nessas faixas é uma característica geral do grupo dos flavonoides, pois é devida ao perfil espectral do anel B (faixa I) e do anel A (faixa II). (OLIVEIRA, 2015)

Por essa razão, o potencial fotoprotetor da rutina vem sendo bastante analisado na última década. Em estudo de Choquenot e colaboradores, 2008, verificou-se que a rutina presente em concentração de 10% (p/p) em emulsões do tipo óleo em água foi capaz de apresentar fator de proteção solar (FPS) equivalente ao do homossalato, reconhecido como filtro UVB. Também foi verificado o efeito sinérgico da combinação da rutina com o dióxido de titânio, um filtro inorgânico (CHOQUENET et al., 2008).

Oliveira e colaboradores associaram a rutina aos filtros benzofenona 3 e avobenzona (filtros UVA) em emulsões óleo-água. O acréscimo da rutina nestas emulsões propiciou uma atividade antioxidante 40 vezes maior. A adição da rutina também surtiu efeitos na melhora do desempenho fotoprotetor da formulação contendo rutina a 0,1% (p/p) e Benzofenona 3 a 6% (p/p). Para esta formulação,

houve aumento do fator de proteção solar (FPS), *in vitro*, de 24 para 33 (um aumento de 54%) e foi observada prevenção da foto-oxidação do filtro UVA. Entretanto, a adição da rutina à Avobenzona propiciou decréscimo do valor de FPS. (OLIVEIRA et al., 2015).

Velasco e colaboradores associaram a rutina aos filtros p-metoxicinamato de octila e benzofenona 3 e constataram elevação de FPS de 7,4 para 9,9, sendo que a eficácia protetora da rutina foi dependente da presença e da concentração dos filtros empregados nas formulações. Verificou-se também que a rutina não associada aos filtros, apresentou eficácia fotoprotetora quando comparada à formulação controle (sem rutina e sem filtros) (VELASCO et al., 2008a).

Visando aumentar a solubilidade da rutina, Oliveira e colaboradores desenvolveram sistemas particulados de gelatina contendo rutina. A atividade antioxidante da rutina encapsulada foi 74% maior do que a da rutina livre. O teste de FPS *in vitro* indicou aumento de 48% com a utilização das nanopartículas de gelatina contendo rutina em combinação com os filtros EDPB, Benzofenona e Avobenzona em relação à formulação de controle (sem rutina). (OLIVERA et al. 2015)

Entretanto, em estudo realizado posteriormente por Oliveira e colaboradores, verificou-se que os ótimos resultados obtidos pelas nanopartículas de gelatina contendo rutina no testes *in vitro* não se repetiram nos testes *in vivo*. (OLIVEIRA et al. 2016)

Pela revisão bibliográfica apresentada, observou-se que os resultados dos testes com combinações de rutina e filtros solares tradicionais em geral foram promissores, mas ainda carecem de estudos mais aprofundados, e especialmente de validação *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Esta pesquisa contemplou o preparo e a caracterização física, físico-química e funcional (eficácia *in vitro* e clínica) de sistemas fotoprotetores multifuncionais compostos pelos filtros solares **avobenzona** e **octil dimetil PABA**, acrescidos do composto bioativo **rutina**. O caráter de multifuncionalidade das formulações foi evidenciado por meio da atividade fotoprotetora contra a radiação UVB e pela característica antioxidante da rutina, constatados por meio dos testes *in vivo* e *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- i. Preparo e avaliação da estabilidade preliminar de formulações fotoprotetoras bioativas multifuncionais compostas por octil dimetil PABA (filtro orgânico UVB), avobenzona (filtro orgânico UVA) e rutina (composto bioativo), associados ou não.
- ii. Determinação das características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras.
- iii. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das preparações.
- iv. Avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* (FPS estimado e comprimento de onda crítico) das formulações, por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração.

v. Avaliação da segurança *in vivo* das formulações de melhor desempenho, por meio dos ensaios de irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização.

vi. Determinação da eficácia clínica das formulações de melhor desempenho por meio da obtenção do fator de proteção solar (FPS) estático e da hidratação superficial da pele.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Os equipamentos (aparatos e dispositivos, entre outros) empregados na presente pesquisa estão descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1: Equipamentos e afins utilizados nesta pesquisa

Equipamentos	Marcas e modelos
Agitador mecânico	IKA® RW 20n
Balança analítica	Shimadzu® AUY 220
Balanças semi-analíticas	Gehaka® BG 4000 e Ohaus® ARD 110
Banho termostaticado	Nova Ética® N480
Banho de ultrassom	Unique® UltraCleaner 1600A
Centrífuga	Hitachi® RX2
Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração	Labsphere® UV 2000S
Micropipetas monocal	Eppendorf® 100-1000 µL e 1,0-10,0 mL
Placa de aquecimento	IKA® HS7
Simulador Solar UVB	Solar Light Co. Inc. Multiport® 601
Sistema purificador de água	Merck Millipore® Mili-Q® Simplicity UV
Peagômetro	Quimis® Q400 AS
Termômetro digital	JProlab®
Viscosímetro rotativo	Fungilab® ViscoStar R

As matérias-primas utilizadas estão descritas no **Quadro 2** e apresentaram grau de pureza cosmético ou farmacêutico.

Quadro 2: Matérias-primas utilizadas nesta pesquisa

Matéria-prima (nome comercial)	Nomenclatura INCI	Fornecedor
BHT	BHT	Mapric®
Triglicérides de ácido caprílico	Caprylic Triglyceride	PharmaSpecial®
EDTA dissódico	Disodium EDTA	PharmaSpecial®
Aristoflex	Ammonium Acryloyldimethyl Taurate/ VP copolymer	PharmaSpecial®
Sistema conservante	Phenoxyethanol (and) methylparaben (and)ethylparaben (and) butylparaben	PharmaSpecial®
Avobenzona	Butyl methoxydibenzoylmethane	PharmaSpecial®
Octil dimetil PABA	Octyl dimethylPABA	Fagron®
Rutina	Rutin	Fagron®

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

Os reagentes e solventes empregados durante as análises estão descritos no **Quadro 3** e apresentaram grau de pureza analítico.

Quadro 3: Reagentes e solventes empregados

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

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

4.2. Preparação das formulações fotoprotetoras bioativas

Foram preparados oito sistemas emulsionados do tipo óleo em água (O/A), contendo o filtro solar UVB octil dimetil PABA e o filtro solar UVA avobenzona, acrescidos do composto bioativo rutina. A combinação de compostos, foi

selecionada com base na aplicação e viabilidade econômica dos filtros solares utilizados, bem como nas características multifuncionais do composto bioativo, que recentemente apresentou propriedades antioxidantes e de absorção da radiação UVB em estudos *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2015).

Os filtros solares, em suas máximas concentrações permitidas pela legislação vigente (3,0% p/p de avobenzona e 8,0% p/p de octil dimetil PABA), foram combinados com 0,1% p/p do composto bioativo, valor passível de solubilização em formulações fotoprotetoras com esta característica e, também, em concordância com o relatado na literatura científica (VELASCO *et al.*, 2008a e 2008b). A Erro! Fonte de referência não encontrada.. Descreve as formulações e suas respectivas composições.

Tabela 2. Composição Quantitativa (% w/w) e Qualitativa das formulações

Composição*	Função	Procedência	Códigos das Formulações (% w/w)							
			F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>BHT</i>	<i>Antioxidante</i>	Mapric®	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>Caprylic Triglyceride</i>	<i>Emoliente</i>	PharmaSpecial®	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
<i>Disodium EDTA</i>	<i>Quelante</i>	PharmaSpecial®	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
<i>Ammonium Acryloyldimethyl Taurate/ VP copolymer</i>	<i>Espessante</i>	PharmaSpecial®	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
<i>Phenoxyethanol (and) methylparaben (and) ethylparaben (and) butylparaben (and) propylparaben (and) isobutylparaben</i>	<i>Sistema conservante</i>	PharmaSpecial®	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
<i>Butyl methoxydibenzoylmethane</i>	<i>Filtro UVA</i>	PharmaSpecial®	–	–	–	–	3.0	3.0	3.0	3.0
<i>Octyl dimethylPABA</i>	<i>Filtro UVB</i>	Fagron®	–	–	8.0	8.0	–	–	8.0	8.0
<i>Rutin</i>	<i>Composto Bioativo</i>	Fagron®	–	0.1	–	0.1	–	0.1	–	0.1
<i>Aqua</i>	<i>Veículo</i>	–	**	**	**	**	**	**	**	**

*Composição quantitativa foi reportada de acordo com INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredient).

** Suficiente para completar 100%.

As matérias-primas utilizadas nas formulações foram pesadas em quantidades equivalentes em % (p/p) daquelas indicadas na **Tabela 2** com o objetivo de elaborar 100,0 g de preparação em balança analítica Shimadzu® AUY 220.

Para a preparação das formulações, separaram-se as matérias-primas em duas fases: aquosa e oleosa. Os sistemas emulsionados preparados foram do tipo (O/A). Os filtros orgânicos, o composto bioativo rutina e o BHT foram solubilizados com os triglicérides de ácido caprílico e compuseram a fase oleosa. Para solubilização do composto bioativo, foi necessário o ajuste de pH para 9,5 -10 por meio da adição de trietanolamina. O EDTA foi solubilizado em água (qsp) para incorporação do agente geleificante co-polímero do ácido sulfônico acrilóil-dimetiltaurato (e) vinilpirrolidona neutralizado, compondo a fase aquosa. Para incorporação do polímero, utilizou-se o agitador mecânico IKA® RW 20n em agitação vigorosa para a formação de um gel de alta viscosidade. A fase oleosa foi aquecida até 75°C e então adicionada na fase aquosa para formação da emulsão em agitação constante.

As formulações finais tiveram seu valor de pH ajustado para 6,5 - 7,5 (compatível com a pele) e então foram armazenadas em local ausente da exposição à luz direta e à temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$). Após 24 horas de repouso, foram observadas suas características organolépticas (aspecto, cor e odor) e foram realizadas as medidas de pH e viscosidade aparente.

4.3. Avaliação Preliminar da Estabilidade

Após o preparo, as formulações fotoprotetoras foram submetidas ao Estudo de Estabilidade Preliminar (EEP), responsável por evidenciar aceleradamente possíveis sinais de instabilidade. O estudo envolveu os ensaios de Centrifugação e Estresse Térmico, realizados após 24 horas de repouso das preparações, a fim de se completar o processo de emulsificação (BABY, 2007).

As formulações foram avaliadas quanto a possíveis alterações visuais – como separação de fases, coalescência ou presença de precipitados – e classificadas como normais (N) ou modificadas (M), sendo consideradas aprovadas em caso de obtenção de conceito normal (N) em ambos os testes (BRASIL, 2004). As formulações em desacordo com os padrões descritos foram consideradas reprovadas e tiveram a sua composição e/ou forma de preparação ajustadas.

4.3.1. Teste de Centrifugação

Após 24 horas da manipulação das amostras, procedeu-se com o teste de centrifugação. Para este teste, foram pesados 5,0 g de cada formulação diretamente dentro dos tubos de centrífuga em balança semi-analítica Ohaus® ARD 110, em réplicas de dois. O teste foi conduzido na centrífuga Hitachi® RX2 de acordo com as seguintes condições experimentais: temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$); velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G) e tempo de teste de 30 minutos (IDSON, 1988).

4.3.2. Teste de Estresse Térmico

Para este teste, 5,0 g de cada formulação foram pesadas e transferidas para tubos de ensaio, em réplicas de dois. Estas amostras foram então submetidas ao estresse térmico, em banho termostaticado Nova Ética® N480, elevando-se gradativamente e de forma controlada o valor inicial de temperatura. O ensaio foi conduzido a partir de 40°C (temperatura inicial) até 80°C (temperatura final), elevando-se a temperatura em 10°C a cada 30 minutos. As formulações foram então retiradas da condição drástica de estudo, ao término de 80°C e avaliadas após atingirem a temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (BRASIL, 2004).

4.4. Caracterização física e físico-química

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

4.4.1. Caracterização do pH

O valor do pH das formulações dermocosméticas foi determinado em pHmetro Quimis® Q400 AS pela imersão direta do eletrodo na dispersão, à temperatura ambiente ($23,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) em réplicas de três.

4.4.2. Caracterização física

Para a determinação da viscosidade aparente, cerca de 15,0 g de formulação foram transferidos para o compartimento de análise do viscosímetro

rotativo (Fungilab® ViscoStar R). A aferição da viscosidade aparente, em centiPoise (cP), foi efetuada após três minutos de agitação, utilizando-se agulha do tipo TR11 e velocidade de agitação de 30 rpm.

4.5. Caracterização funcional *in vitro*

4.5.1. Determinação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante do composto bioativo e das formulações fotoprotetoras multifuncionais foi determinado por meio da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•), de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações (SHARMA; BHAT, 2009).

Alíquotas de 0,5 g de cada uma das formulações foram transferidas para tubos Falcon com adição de 5,0 mL de metanol 99,8% e estes foram homogeneizados em vórtex até solubilização dos componentes. Posteriormente, alíquota de 1,0 mL de cada uma das amostras previamente solubilizadas foram adicionadas de 2,0 mL de solução metanólica de DPPH• a 70,0 µM em tubos de ensaio devidamente identificados e armazenados em local protegido da luz para início da contagem do tempo reacional. Após 30 minutos de reação, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente em espectrofotômetro UV-visível Thermo Scientific® Evolution 600 no comprimento de onda de 517 nm, em cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Como controle negativo, foi utilizado o metanol. Para o cálculo da porcentagem de radicais livres sequestrados, foi utilizada a Equação 1.

Equação 1: Equação para cálculo da porcentagem de radicais livres sequestrados

$$\% \text{ Sequestro de radicais livre} = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle}}$$

4.5.2. Eficácia fotoprotetora - Fator de Proteção Solar (FPS) estimado

A eficácia fotoprotetora estimada *in vitro* das formulações foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração (*Labsphere UV-2000S[®] Transmittance Analyzer*). Para o ensaio, alíquotas das formulações foram pesadas e aplicadas uniformemente, sob a forma de filme fino e uniforme de 1,3 mg/cm² (COLIPA, 2011) sobre a superfície de fita adesiva *TransporeTM 3M* fixadas sobre placas de quartzo.

Após secagem de 30 minutos, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica, utilizando uma placa de quartzo e fita adesiva *TransporeTM 3M* sem produto, como branco de leitura. Foram empregadas, no mínimo, cinco leituras de transmitância por placa avaliada.

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

4.6. Ensaio Clínicos

As formulações de melhor desempenho nos testes *in vitro* foram selecionadas para a realização dos testes de segurança e eficácia clínica.

4.6.1. Aspectos legais e éticos

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

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

Previamente aos ensaios, os participantes foram entrevistados e avaliados considerando os critérios de inclusão e exclusão exigidos pela legislação vigente. Os critérios de inclusão foram os seguintes: **(i)** participantes saudáveis; **(ii)** ambos os sexos; **(iii)** idade entre 18 e 60 anos; **(iv)** pele íntegra na região de teste; e **(v)** concordância em aderir aos procedimentos do estudo, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão foram os seguintes: **(i)** gestação ou lactação; **(ii)** histórico de reações fototóxicas, fotoalérgicas ou patologias fotoinduzidas; **(iii)** histórico

pessoal ou familiar de câncer de pele; **(iv)** uso de medicações anti-inflamatórias, imunossupressoras ou fotossensibilizantes - tópicas ou sistêmicas - até um mês antes do início do estudo; **(v)** presença de queimadura solar ou bronzeados no local dos testes; **(vi)** tom de pele desigual na região do estudo; **(vii)** presença de dermatoses inflamatórias, lesões névicas, manchas, queratose seborréica, patologias ativas ou excesso de pelos no local do teste; e **(viii)** alergias conhecidas a qualquer componente das formulações (BRASIL, 2012c; COSMETICS EUROPE, 1997; MC NAMEE *et al.*, 2008).

4.6.2. Ensaios de segurança das formulações

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

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

4.6.2.1. Irritação cutânea primária e Irritação cutânea acumulada

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

O ensaio foi realizado com aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso de 60 participantes do estudo. O tempo de contato das formulações com a pele foi de 48 horas para o ensaio de irritação cutânea primária e três semanas (com troca do apósito contendo as formulações e o controle negativo a cada 48 horas) para o ensaio de irritação cutânea acumulada. Após cada troca do apósito, e ao final dos ensaios, a pele dos participantes foi avaliada com relação à possíveis reações de irritação (BRASIL, 2012a; COSMETICS EUROPE, 1997).

4.6.2.2. Sensibilização dérmica

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

O ensaio foi realizado simultaneamente aos ensaios de irritação cutânea (*item 4.6.2.1.*), utilizando os mesmos participantes e amostras. Após o período de três semanas de contato das formulações e do controle negativo com a pele, durante o ensaio de irritação cutânea acumulada (período de indução), os participantes ficaram em período de repouso de duas semanas, sem contato com as formulações em teste (período de repouso).

Em seguida, um novo apósito contendo as mesmas quantidades das formulações e do controle negativo foi aplicado no dorso dos participantes, em área onde nenhum apósito havia sido aplicado anteriormente (período de desafio). Após dois dias, o apósito foi removido, com avaliação das áreas

referentes ao teste de desafio com relação a possíveis reações de sensibilização (BRASIL, 2012a, COSMETICS EUROPE, 1997).

4.6.2.3. Fotoirritação cutânea

O ensaio de fotoirritação tem por objetivo comprovar a ausência do potencial irritante de um produto aplicado na pele, quando exposto à radiação UVA. O ensaio foi realizado com aplicação de 0,1 g das formulações e do controle negativo, de maneira oclusiva, no dorso de 27 participantes do estudo. Após 24 horas, o apósito foi removido e os sítios de aplicação foram avaliados e submetidos a radiação UVA artificial, com irradiância de 10 mW/cm² e dose de 4 J/cm², equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

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

4.6.2.3. Fotossensibilização dérmica

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

O ensaio foi efetuado simultaneamente ao ensaio de fotoirritação (*item 4.9.3.*), utilizando os mesmos participantes e amostras. Durante o período de indução, com duração de três semanas, as formulações e o controle negativo foram aplicados de maneira oclusiva, no dorso dos participantes do estudo, duas vezes

por semana. Após 24 horas de cada aplicação, o apósito foi removido e os sítios de aplicação foram avaliados e submetidos a radiação UVA artificial, com irradiância de 10 mW/cm² e dose de 4,0 J/cm², equivalente a tempo de exposição de 6 minutos e 40 segundos.

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

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

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

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

4.6.3. Eficácia das formulações

4.6.3.1. Fator de proteção solar (FPS)

A caracterização funcional *in vivo* foi realizada por meio da avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS), método amplamente aceito para a avaliação da eficácia fotoprotetora de formulações cosméticas (BRASIL, 2012b; COSMETICS EUROPE, 2006; 2011; UNITED STATES, 2011).

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

Alíquotas de 2,0 mg/cm² das formulações de melhor desempenho nos ensaios *in vitro*, e do padrão (formulação com FPS conhecido), foram aplicadas

uniformemente no dorso de 10 voluntários, em áreas previamente delimitadas (35,0 cm²) e limpas com algodão seco. Após 15 minutos de secagem, as áreas de aplicação foram submetidas a irradiação UVB artificial, com dose definida de acordo com o FPS estimado das formulações e a DEM individual de cada participante (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

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

Após 16 a 24 horas da irradiação, as áreas de aplicação foram avaliadas por pesquisador validado quanto ao teste e o cálculo do FPS *in vivo* foi realizado conforme a **Equação 2** (BRASIL, 2012b; UNITED STATES, 2011).

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

Equação 2: Fator de proteção solar (FPS) *in vivo*. Na qual:

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

DEMnp = dose eritematogênica mínima na pele não protegida.

4.6.3.2. Hidratação superficial da pele

A hidratação superficial da pele foi realizada por meio do método de corneometria em 20 voluntários do sexo feminino e masculino com idades entre 20 e 35 anos. Os procedimentos foram informados oralmente e através do TCLE escrito. Os voluntários compareceram ao Instituto para avaliação médica inicial e verificação do cumprimento dos critérios de inclusão e não-inclusão. Em seguida, permaneceram durante 30 minutos em sala com condições ambientais controladas (20 ± 2°C e 50 ± 5% de umidade relativa) para climatização, e

tiveram demarcados os sítios de aplicação e medição corneométrica iniciais e finais em seus antebraços. Um dos antebraços foi submetido à aplicação do produto-teste, enquanto o outro foi utilizado como controle (segundo aleatorização).

Os procedimentos envolveram a aplicação de apósitos epicutâneos no antebraço dos voluntários durante 8 horas, com medições iniciais (t0), 2 horas (t2), 4 horas (t4) e 8 horas (t8). As formulações analisadas (F7 e F8) foram aplicadas no antebraço de cada participante, com auxílio de seringa de 1mL descartável, em sítios randomizados previamente demarcados em quantidade padronizada de 2 mg/cm². Em seguida, as formulações foram espalhadas com dedo protegido por dedeira de látex descartável, de modo padronizado. A medida da hidratação cutânea foi realizada através do Corneometer MPA 580 (MultiProbeAdapter – Courage&Khazaka) e todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.7. Análise estatística dos resultados

Os dados foram avaliados pelo programa Minitab®, versão 17. As análises foram realizadas em triplicata, sendo o nível de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$). Nas comparações entre duas amostras, os resultados foram avaliados de acordo com o teste estatístico *t-Student*, enquanto que nas comparações entre três ou mais amostras, o teste estatístico utilizado foi o ANOVA *One-Way*, seguido de teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação das Formulações

A preparação das formulações fotoprotetoras contemplou a elaboração de oito sistemas emulsionados O/A. As preparações foram macroscopicamente analisadas, após o período de repouso de 24 horas, necessário para a finalização do processo de emulsificação pelos agentes emulsionantes, verificando-se criteriosamente aquelas consideradas aparentemente estáveis com características organolépticas adequadas, segundo critérios do formulador e também referendadas pela literatura (BABY, 2007).

A base selecionada para o preparo das formulações foi o Aristoflex® AVC, um polímero sintético do ácido sulfônico de manipulação conveniente. Este agente foi selecionado em decorrência de suas propriedades, como estabilidade em ampla faixa de pH (4,0 - 9,0), compatibilidade com solventes orgânicos polares e estabilidade frente à radiação UV, quando comparado com carbômeros (ATTWOOD, 2005; PHARMASPECIAL, 2014).

Para a solubilização dos filtros, optou-se pelos triglicérides de ácido caprílico, que permitiram a incorporação dos compostos ativos (filtros orgânicos) na fase oleosa das preparações.

5.2. Avaliação Preliminar da Estabilidade

A estabilidade das emulsões fotoprotetoras foi verificada por meio dos testes de centrifugação e estresse térmico, utilizados para acelerar possíveis sinais de instabilidades inerentes aos sistemas emulsionados (BRASIL, 2004). A

Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para ambos os testes.

Tabela 4: Características organolépticas das formulações submetidas ao estudo de estabilidade preliminar.

Formulações		Estudo de Estabilidade Preliminar	
		Centrifugação	Estresse Térmico
F1	Base	N	N
F2	R	N	N
F3	OD	N	N
F4	OD+R	N	N
F5	AV	N	N
F6	AV+R	N	N
F7	AV+OD	N	N
F8	AV+OD+R	N	N

Legenda: N=normal; M=modificado; R=rutina; OD=Octil dimetil PABA; AV=avobenzona;

As formulações foram consideradas estáveis, recebendo a classificação de N (normais) após a realização dos testes de estabilidade preliminar (ANSEL et al., 2000; SALAGER, 2000).

Cada componente, ativo ou não, pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade da formulação (ANVISA, 2004). Por este motivo, a realização dos testes de estabilidade preliminar é essencial para a determinação da estabilidade de uma formulação.

A escolha do polímero Aristoflex® AVC, como agente de consistência, auxiliou na obtenção de resultados positivos nesta etapa do estudo. Suas características, como ampla estabilidade físico-química, possibilitaram a incorporação dos princípios ativos diversos ao veículo, além de permitir elevada consistência às formulações, evitando a perda da viscosidade durante a execução dos testes.

Como todas as amostras não sofreram modificações após a Avaliação Preliminar de Estabilidade, todas as formulações fotoprotetoras foram selecionadas para realização dos ensaios futuros.

5.3. Caracterização física e físico-química

As formulações fotoprotetoras foram analisadas visualmente, 24 horas após o preparo, quanto às suas características organolépticas (aspecto, cor e odor). Adicionalmente, as características físicas e físico-químicas das preparações foram mensuradas, respectivamente, por meio dos testes de viscosidade aparente e valor de pH. O valor de pH das formulações foi corrigido para compatibilização com o pH da pele. As **Tabelas 5 e 6** apresentam os resultados para as formulações fotoprotetoras multifuncionais **F1 a F8**.

Tabela 5: Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras multifuncionais F1, F2, F3 e F4.

Formulações		Aspecto	Características Organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente(cP) TR11 / rpm 20
F1	Base		Emulsão homogênea, branca opaca de odor característico forte	6,7 ± 0,1	33950 ± 1560
F2	R		Emulsão homogênea, branca amarelada de odor característico médio	6,9 ± 0,1	32575 ± 789
F3	OD		Emulsão homogênea, branca opaca de odor característico muito fraco	6,9 ± 0,2	19800 ± 2150
F4	OD+R		Emulsão homogênea, branca levemente amarelada de odor característico fraco	6,9 ± 0,1	10700 ± 2490

Legenda: R=rutina; OD=Octil dimetil PABA; Resultados de valores de pH expressos como média ± desvio padrão

Tabela 6: Características organolépticas, físicas e físico-químicas das formulações fotoprotetoras multifuncionais F5, F6, F7 e F8.

Formulações		Aspecto	Características Organolépticas	Valor de pH	Viscosidade aparente(cP) TR11 / rpm 20
F5	AV		Emulsão homogênea, branca com nuance amarela de odor característico médio	6,9 ± 0,1	35100 ± 500
F6	AV+R		Emulsão homogênea, branca levemente amarelada de odor característico médio	6,9 ± 0,1	24350 ± 1356
F7	AV+OD		Emulsão homogênea, branca levemente amarelada de odor característico forte	7,32 ± 0,2	26950 ± 1046
F8	AV+OD+R		Emulsão homogênea, branca amarelada de odor característico fraco	7,35 ± 0,1	35675 ± 657

Legenda: R=rutina; OD=Octil dimetil PABA; AV=avobenzona; Resultados de valores de pH expressos como média ± desvio padrão.

5.4. Caracterização Funcional *in vitro*

5.4.1. Atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras

O potencial antioxidante das formulações contendo o composto bioativo rutina foi determinado por meio da ação sequestradora do radical livre DPPH•. Compostos antioxidantes reagem com o DPPH• doando um hidrogênio à molécula e, portanto, reduzindo-a, resultando em decréscimo nos valores de absorbância mensurados a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; OZCELIK; LEE; MIN, 2003; SHARMA; BHAT, 2009).

O solvente selecionado foi o metanol. A concentração da solução metanólica de DPPH• definida para a execução dos ensaios foi de 70 µM, já que a concentração inicial da solução de DPPH• deve fornecer valores de absorbância menores do que 1,0 (valor limite para a acurácia da leitura espectrofotométrica), o que implica em solução de DPPH• com concentração máxima de 100 µM. Por fim, o tempo de reação foi definido em 30 minutos, já que a rutina é considerada um composto de cinética rápida (YANG et al., 2008; GALLEANO et al., 2010)

A capacidade de redução dos radicais de DPPH• foi determinada por meio do decréscimo em sua absorbância a 517 nm induzida pelo composto antioxidante presente na formulação. Este decréscimo foi visivelmente percebido desde o início da reação pela imediata descoloração da solução de roxo para amarelo. Esta mudança pode ser observada na **Figura 4**.

Figura 4: Amostras das formulações fotoprotetoras bioativas em reação com o radical livre DPPH•



Foi realizada leitura em triplicada de cada uma das amostras em espectrofotômetro a 517 nm, com cubeta de caminho ótico de 1 cm. Os resultados das absorvâncias e atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras, expressas em porcentagem de inibição do radical livre DPPH•, podem ser encontrados na **Tabela 7**. O gráfico comparativo destes resultados, pode ser avaliado na **Figura 5**.

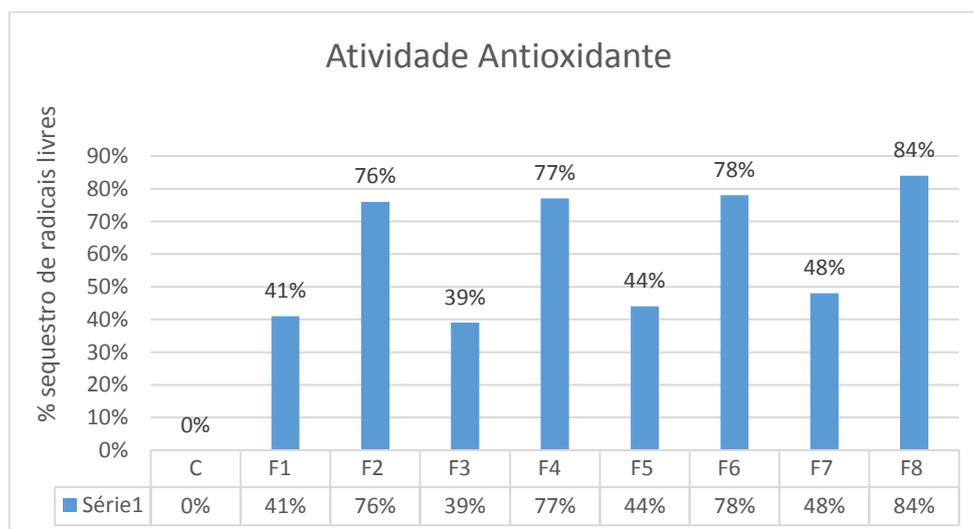
Tabela 7: Análise da % de inibição de radicais livres das formulações fotoprotetoras bioativas após reação com o radical DPPH•

Formulações		% INIBIÇÃO DE RADICAIS LIVRES			
		Abs 1	Abs 2	Abs 3	Atividade Antioxidante (%)
Controle negativo	Metanol+ DPPH	0,525	0,525	0,526	0,00%
F1	Base	0,311	0,311	0,310	40,86% ± 0,002 ^G
F2	R	0,124	0,124	0,124	76,4% ± 0,000 ^D
F3	OD	0,322	0,322	0,321	38,77% ± 0,002 ^H
F4	OD+R	0,122	0,122	0,122	76,78% ± 0,000 ^C
F5	AV	0,296	0,297	0,296	43,59% ± 0,002 ^F
F6	AV+R	0,113	0,113	0,113	78,49% ± 0,000 ^B
F7	AV+OD	0,272	0,272	0,271	48,29% ± 0,002 ^E
F8	AV+OD+R	0,085	0,085	0,086	83,76% ± 0,001 ^A

Legenda: R=rutina; OD=Octil dimetil PABA; AV=avobenzona; Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

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

Figura 5: Gráfico da atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras bioativas

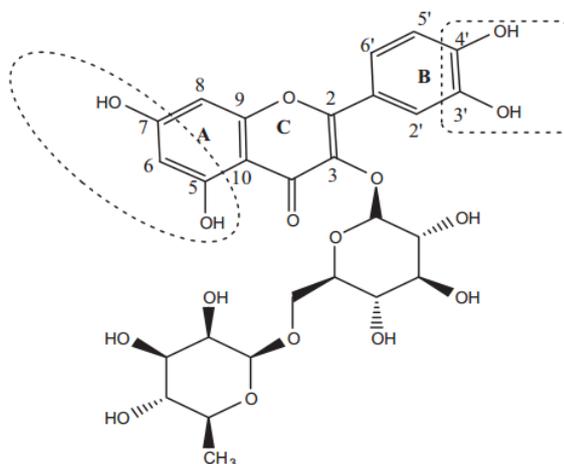


Legenda: C= Controle; F1 = Base; F2= Rutina; F3=Octil dimetil PABA; F4= Octil dimetil PABA + Rutina; F5= Avobenzona; F6= Avobenzona + Rutina; F7= Avobenzona + Octil dimetil PABA; F8= Avobenzona + Octil dimetil PABA + Rutina; Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

Foi possível constatar que as formulações contendo o composto bioativo rutina (F2, F4, F6 e F8) apresentaram atividade antioxidante superior àquelas que não a continha. Estes resultados foram esperados, considerando o potencial antioxidante comprovado do composto bioativo rutina (YANG et al., 2008) e a ausência de potencial antirradicalar dos filtros UV, perfil corroborado por Oliveira e colaboradores, 2015.

Por meio da comparação entre os pares de formulações contendo ou não o composto bioativo, foi possível identificar que a presença da rutina elevou a capacidade antioxidante da formulação em, aproximadamente, 40%. Essa atividade foi elevada devido às propriedades da molécula, que envolvem a reatividade dos grupos hidroxila presentes em seus anéis. A atividade antioxidante está principalmente relacionada com a ressonância de elétrons no núcleo aromático da estrutura, no qual os grupos hidroxila são componentes fundamentais. A **Figura 6** ilustra os radicais hidroxila que representam papel fundamental na propriedade antioxidante da rutina (OLIVEIRA, et al., 2015).

Figura 6: Estrutura química da rutina e grupos hidroxila responsáveis pela capacidade antioxidante da molécula (OLIVEIRA et al., 2015)



Afim de compreender melhor a relação entre a estrutura química da rutina e sua atividade antioxidante, Lue e colaboradores, 2010, compararam a atividade antioxidante da rutina à de dois de seus ésteres (possuindo grupamentos acila nos carbonos C12 e C16) e ao BHT. Foi constatado que, *in vitro*, os ésteres apresentaram poder redutor e habilidade quelante de metais inferiores aos apresentados pela rutina, porém, semelhante atividade sequestradora do radical livre DPPH• (LUE et al., 2010). A capacidade quelante da rutina e de outros flavonoides se deve primordialmente à presença de grupamento catecol, conforme indicado por Cherrak e colaboradores, 2016 (CHERRAK et al., 2016).

Os resultados obtidos neste ensaio foram corroborados com os estudos de Oliveira e colaboradores, 2015, em que a associação da rutina aos filtros benzofenona-3 e avobenzona (filtros UVA), em emulsões óleo-em-água, propiciou acréscimo na atividade antioxidante em 40 vezes quando comparado com a mesma formulação sem a adição do composto bioativo (OLIVEIRA et al., 2015).

Considerando os resultados apresentados neste ensaio e a literatura, foi possível constatar que formulações fotoprotetoras contendo compostos bioativos como a rutina representam estratégia promissora no desenvolvimento de formulações multifuncionais, devido à capacidade que estas moléculas possuem de absorver radiação UV e de sua significativa atividade antioxidante, capaz de inibir a formação de radicais livres na superfície da pele quando expostos à radiação solar.

Para maximizar a ação destas moléculas em camadas cutâneas mais profundas, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias que possibilitem o aumento da solubilidade e permeação destas através da pele. Assim, estudos têm testado novas estratégias de incorporação da rutina em formulações

cosméticas. Pesquisadores desenvolveram substâncias derivadas da rutina, objetivando conservar as propriedades antioxidante, mas com solubilidade (aquosa ou lipídica) superior (PEDRIALI, 2012; BALDISSEROTTO et al., 2015). Demais estão estudando a utilização da rutina em sistemas particulados de gelatina ou carreadores lipídicos nanoestruturados (KAMEL et al., 2015; OLIVEIRA, 2015)

5.4.2. Eficácia fotoprotetora estimada *in vitro*

A eficácia fotoprotetora estimada *in vitro* de todas as formulações aprovadas nos testes de estabilidade preliminar (F1 a F8) foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. O tratamento dos dados de transmitância na faixa do UVA e UVB foi realizado pelo programa computacional acoplado ao equipamento, responsável por converter os valores de transmitância em resultados de FPS e comprimento de onda crítico (nm) das formulações fotoprotetoras. A **Tabela 8** fornece os dados de eficácia fotoprotetora estimada das formulações fotoprotetoras multifuncionais.

Tabela 8: Valores de FPS e comprimento de onda crítico *in vitro* das formulações fotoprotetoras multifuncionais.

Formulações	Valor de FPS	λ crítico (nm)
F1 Base	1,00 ^D ± 0,02	NA
F2 R	1,05 ^D ± 0,02	NA
F3 OD	8,85 ^{BC} ± 0,69	319,64 ^E ± 1,73
F4 OD+R	7,50 ^C ± 1,25	330,07 ^D ± 5,70
F5 AV	2,41 ^D ± 0,56	379,89 ^{BC} ± 0,40
F6 AV+R	2,25 ^D ± 0,05	379,85 ^{BC} ± 0,26
F7 AV+OD	15,05 ^A ± 0,14	373,74 ^C ± 1,30
F8 AV+OD+R	9,46 ^D ± 0,42	375,15 ^C ± 0,67

Legenda: R=rutina; OD=Octil dimetil PABA; AV=avobenzona; Resultados de eficácia fotoprotetora expressos como média ± desvio padrão.

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

A realização dos testes de fotoproteção *in vitro* é essencial para prever os parâmetros de eficácia fotoprotetora de forma rápida, econômica e segura (uma vez que poupa os voluntários da exposição às radiações UV empregadas nas análises *in vivo*). Este ensaio permite a obtenção de dados que são fundamentais para o delineamento dos ensaios *in vivo*, uma vez que é preciso definir a quantidade de radiação que será emitida através da fonte UV durante os ensaios com voluntários para evitar uma energia demasiada que possa tornar o experimento desconfortável (PELIZZO et al. ,2012).

Os principais parâmetros avaliados neste teste são o Fator de Proteção Solar (FPS), responsável por medir a proteção contra a radiação UVB, e o comprimento de onda crítico (λ crit), que fornece a amplitude de proteção considerando o espectro completo da radiação UV (UNITED STATES, 2011).

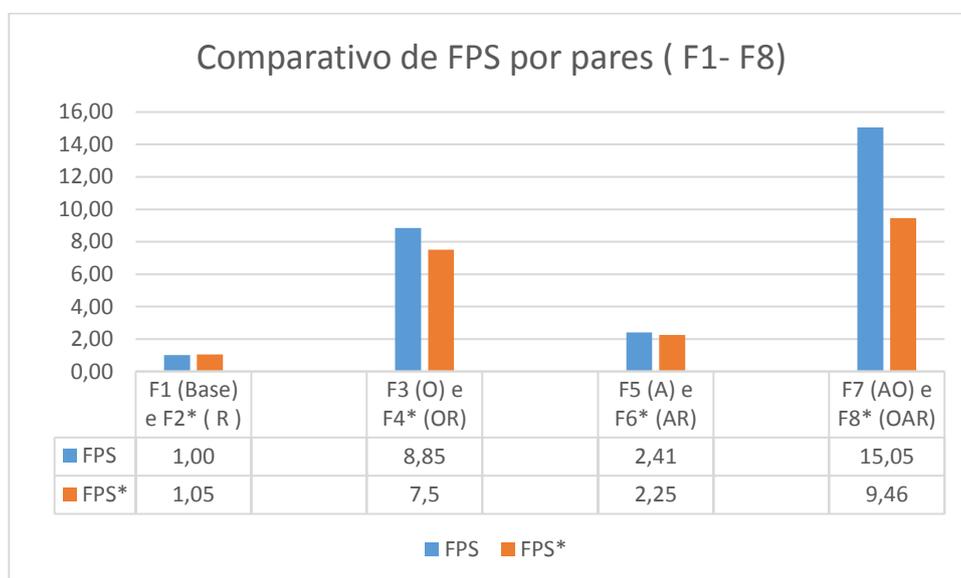
Pela Legislação Brasileira, uma formulação pode ser classificada como fotoprotetora apenas se apresentar FPS acima de 6, com comprimento de onda crítico acima de 370 nm e UVA-PF equivalente a, no mínimo, 1/3 do FPS (BRASIL, 2012). Partindo-se destes dados, foi possível identificar que apenas duas das amostras foram consideradas fotoprotetoras (valor de FPS acima de 6 e comprimento de onda crítico acima de 370 nm), a saber: F7 e F8. Tal resultado é compatível com a composição dessas amostras, já que são as únicas que apresentaram a combinação de filtros solares capazes de atuar no espectro de absorção de UVA (avobenzona) e UVB (octil dimetil PABA). Apenas a F7 pode ser definida como de amplo espectro (valor de FPS acima de 15 e comprimento de onda crítico acima de 370 nm).

As formulações em pares F3 - F4 e F5 - F6, não desenvolveram diferenças na eficácia anti-UVB em função da presença da rutina, no entanto, o par F7 e F8

obteve redução do FPS *in vitro*, quando os filtros UV foram adicionados ao composto bioativo. Em relação ao lambda crítico, as diferenças não foram significativas. Em relação ao FPS, as preparações ausentes de filtros e do composto bioativo não geraram eficácia fotoprotetora estimada *in vitro*.

As **Figuras 7 e 8** representam as diferenças obtidas de FPS e lambda crítico para cada uma das formulações.

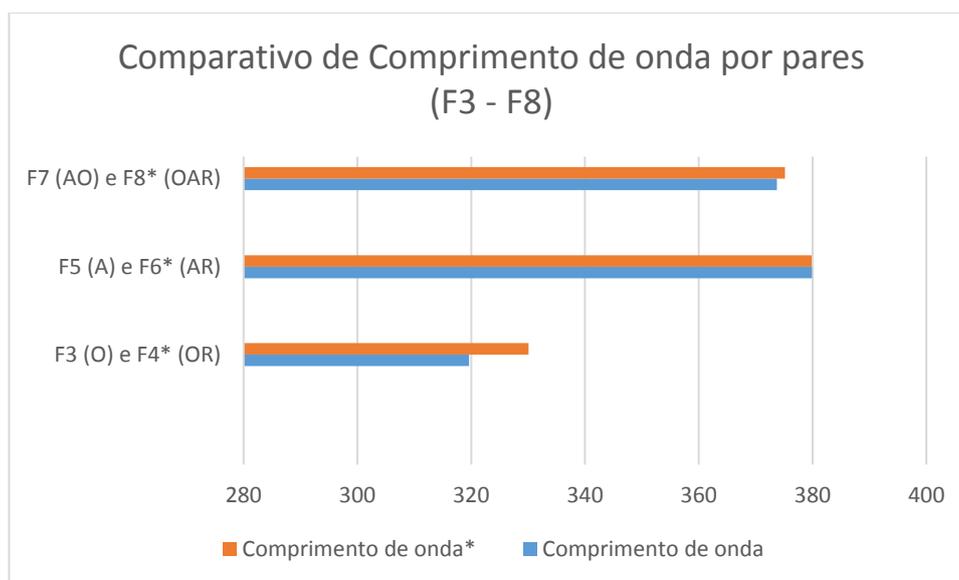
Figura 7 – Comparativo dos valores de FPS obtidos para as formulações fotoprotetoras F1 - F8 por pares



A **Figura 7** ilustra um panorama dos diferentes valores de FPS obtidos para todas as formulações, permitindo comparação entre os pares (com e sem rotina). Foi possível verificar que a redução de FPS nos pares F1/F2, F3/F4 e F5/F6 não foi significativa, enquanto que no par F7/F8 esta queda foi pronunciada, permitindo constatar que a rotina afetou o desempenho da formulação quanto ao FPS, reduzindo o seu valor em cerca de 37%. A

metodologia *in vitro* apresenta diversas limitações quando utilizada para substâncias com capacidade antioxidante, como a rutina (PERES, 2015).

Figura 8 – Comparativo dos valores de lambda crítico obtidos para as formulações fotoprotetoras F3 - F8 por pares



Analisando o lambda crítico entre os diferentes pares de formulações na **Figura 8**, permitiu-se comparar os valores obtidos para as diferentes amostras e verificar que as diferenças entre os pares (com e sem rutina) não foram significativas, com exceção do par F3/F4, indicando que a amplitude de proteção foi aumentada com a adição da rutina ao filtro octil dimetil PABA (UVB).

5.5. Ensaios Clínicos

5.5.1. Ensaios de Segurança

Os estudos de segurança por compatibilidade representam o primeiro contato do produto acabado em seres humanos e têm por objetivo comprovar a segurança pré-determinada por dados pré-clínicos e minimizar os riscos de

reações adversas. Com esses estudos, é possível avaliar mecanismos irritativos e/ou alergênicos de um produto na população estudada, oferecendo aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco (BRASIL, 2012a).

Em 2011 o Brasil foi classificado como o terceiro maior mercado consumidor de produtos cosméticos do mundo, permitindo aumento na variedade de matérias-primas de diferentes origens no mercado, originando maior possibilidade de aparecimento de reações adversas. Por este motivo, a preocupação com a segurança e eficácia destes produtos foi intensificada, mesmo que raramente eles possam causar danos severos à saúde (BRASIL, 2005). Para a avaliação das possíveis reações que podem ser apresentadas por estes produtos, a legislação brasileira exige que os fabricantes avaliem a segurança e a eficácia de seus produtos. Por este motivo, é de fundamental importância a realização destes testes antes da determinação da eficácia das formulações (BRASIL, 2005).

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

Os ensaios clínicos foram iniciados após a comprovação de qualidade das formulações, em parceria com a empresa IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada. Os participantes foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, e apresentaram idade entre 19 e 54 anos e fototipo de pele entre I e IV, de acordo com a escala de Fitzpatrick.

Durante os ensaios, os participantes foram acompanhados por médico dermatologista e avaliados com relação aos seguintes parâmetros: **(i)** sensações de desconforto sentidas durante ou após o estudo; e **(ii)** sinais clínicos apresentados, como eritema, edema e descamação, entre outros. Os resultados obtidos nos ensaios de segurança *in vivo* são apresentados na **Tabela 9** e foram avaliados de acordo com a escala de Draize para a formação de edemas e eritemas (DRAIZE; WOODWARD; CALVERY, 1944).

Tabela 9: Ensaios de segurança *in vivo* das formulações

Ensaio Clínico	Participantes avaliados	Escala de Draize (edemas e eritemas)	
		Formulação F7 (OD+AV)	Formulação F8 (OD+AV+R)
Irritação cutânea primária e acumulada	57	Escala 0	Escala 0
Sensibilização dérmica	57	Escala 0	Escala 0
Fotoirritação cutânea	27	Escala 0	Escala 0
Fotossensibilização dérmica	27	Escala 0	Escala 0

Legenda: **OD+AV** = Octil dimetil PABA + Avobenzona; **OD+AV+R** = Octil dimetil PABA + Avobenzona + Rutina; **Escala de Draize = 0:** ausência de edemas e eritemas em todos os participantes do estudo.

Os dados da **Tabela 9** comprovaram a segurança das formulações avaliadas, visto que as mesmas não provocaram reações adversas, sinais clínicos ou sensação de desconforto nos participantes, independente do estudo. Estes resultados corroboraram os dados de segurança *in vitro*, reportados na literatura,

sobre a segurança dos filtros solares e composto bioativo utilizados, garantindo a sua segurança quando incorporados às formulações fotoprotetoras multifuncionais (KOCKLER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2005; MANCUSO; SANTANGELO, 2014; TUCHINDA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010).

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

5.5.2. Ensaios de Eficácia

5.5.2.1. Fator de proteção solar (FPS)

As formulações de melhor desempenho, F7 e F8, foram avaliadas clinicamente por meio da avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS).

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

(COSMETICS EUROPE, 2011). Os resultados de FPS *in vivo* das formulações de melhor desempenho estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Fator de Proteção Solar (FPS) *in vivo* das formulações fotoprotetoras

Formulação (Composição)	Fator de Proteção Solar (FPS)	IC 95	% do IC 95 em relação à média (aprovado se < 17%)
Formulação Padrão (Padrão P2 Cosmetics Europe – FPS 15)	16,4 ± 2,9	2,09	12,76 (Aprovado)
F7 (OD+AV)	7,3 ± 0,6^A	0,43	5,84 (Aprovado)
F8 (OD + AV+ R)	12,4 ± 1,1^B	0,81	6,52 (Aprovado)

Legenda: OD = octil dimetil PABA; AV = avobenzona; R = rutina.

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

Os resultados indicaram que a presença da rutina em combinação com os filtros elevou o FPS da formulação, apresentando valor de FPS 7,30 para F7 (OD+AV) e 12,37 (OD+AV+R) para F8 –aumento de 70% no valor final do FPS. Tal resultado demonstrou que a rutina, em ensaio *in vivo*, foi capaz de aumentar o FPS quando associada com os filtros químicos, distintamente dos resultados *in vitro* apresentados nesta pesquisa. Tal resposta pode ser justificada por dois fatores: o primeiro, a limitação da metodologia *in vitro* e, o segundo, o potencial antioxidante da rutina.

Com relação ao primeiro, é sabido que a metodologia *in vitro* apresenta repetibilidade variada em relação com a análise *in vivo*. Ademais, o uso de adjuvantes como catalisadores, antioxidantes (como a rutina), imunomoduladores, solventes e agentes formadores de filme podem aumentam

esta falta de correlação. O segundo ocorre em função de os compostos bioativos antioxidantes atuarem como sequestradores de radicais livres, capturando espécies reativas de oxigênio que são produzidas pela ação da radiação UV em contato com a pele e responsáveis, entre outras ações, pelo eritema desenvolvido após a exposição solar. Conseqüentemente, quando estes radicais são inativados por substâncias antioxidantes como a rutina, o FPS *in vivo* tende a aumentar, já que é dependente da formação de eritema (GILABERTE et al., 2010). A capacidade fotoprotetora da rutina em combinação com outros filtros da formulação, portanto, relacionou-se com seu potencial antioxidante já demonstrado no teste com DPPH *in vitro* nesta pesquisa e confirmado por outros trabalhos já realizados pelo Grupo, em que a rutina associada com os filtros avobenzona e benzofenona-3 elevou em 40 vezes a capacidade antioxidante da formulação sem a presença do composto bioativo (OLIVEIRA et al., 2015).

5.5.2.2. Hidratação superficial da pele

A avaliação da hidratação cutânea superficial *in vivo* foi realizada por meio do teste de corneometria, utilizando água como controle negativo (PINNAGODA et al., 1990). Para esta avaliação, os participantes foram selecionados de acordo com os termos de inclusão e exclusão estabelecidos para o estudo, apresentaram idade entre 18 e 60 anos. Os resultados de hidratação *in vivo* das formulações de melhor desempenho, F7 e F8, estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de hidratação superficial da pele pelo método de corneometria

Valores de Hidratação superficial da pele (Corneometria)				
	t0	t2h	t4h	t8h
C (Controle)	37,05 ± 4,16 ^A	37,63 ± 3,83 ^A	38,6 ± 4,23 ^A	38,25 ± 3,88 ^A
F7 (OD+AV)	37,25 ± 8,37 ^A	37,24 ± 13,82 ^A	37,49 ± 8,51 ^A	37,00 ± 6,36 ^A
F8 (OD+AV+R)	36,16 ± 5,93 ^A	42,01 ± 12,58 ^A	40,78 ± 8,12 ^A	37,37 ± 6,56 ^A

Legenda: OD = octil dimetil PABA; AV = avobenzona; R = rutina; C= controle

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

Os resultados apresentados demonstraram que a rutina não provocou impacto significativo na hidratação superficial da pele por meio das formulações. Modificações na formulação como adição de formadores de filme poderiam alterar tal resultado (OLIVEIRA et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

✓ *Preparação das formulações fotoprotetoras e estabilidade*

Todas as emulsões preparadas apresentaram-se macroscopicamente estáveis e com valor de pH compatível com a pele.

✓ *Atividade antioxidante das formulações fotoprotetoras*

As formulações contendo o composto bioativo rutina apresentaram potencial antioxidante, aproximadamente, 40% superior às formulações que não a continham.

✓ *Eficácia fotoprotetora estimada (FPS) *in vitro**

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das oito preparações foi determinada por meio do equipamento de espectrofotometria de refletância difusa. As formulações que apresentaram valor de FPS acima de 6 e comprimento de onda crítico superior a 370 nm foram as formulações **F7** e **F8**, selecionadas para realização dos testes clínicos de segurança e eficácia, por serem consideradas fotoprotetoras pela legislação brasileira.

✓ *Ensaio de segurança *in vivo**

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

✓ Eficácia fotoprotetora *in vivo*

A formulação **F8**, contendo o composto bioativo rutina, apresentou aumento de 70% no valor de FPS *in vivo*, comparativamente à formulação **F7**, ausente do composto bioativo. No entanto, nenhuma das duas formulações foi considerada de amplo espectro de proteção, visto que apresentaram valores de FPS *in vivo* abaixo de 15.

✓ Hidratação superficial da pele

As formulações F7 e F8 não apresentaram diferenças nas medidas de hidratação cutânea superficial, demonstrando ausência de correlação entre o composto bioativo antioxidante e a hidratação da pele.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, L. da S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. *Diálogos e Ciência*. Ano V, n. 12, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. v.1, 47p. (Séries temáticas da ANVISA. Qualidade em cosméticos, 1).

ARORA, A. ; NAIR, M. ; STRASBURG, G. Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System, *Free Radical Biology and Medicine*, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

ATTWOOD, David. Sistemas dispersos. In: AULTON, Michael E.. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 6, p. 84-99.

BABY, A.R. Avaliação *in vitro* da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas. São Paulo, 2007. 144p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

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 rutina 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.

BALDISSEROTTO, A. ; VERTUANI, S. ; BINO, A. ; DE LUCIA, D. ; LAMPONENTI, I. ; MILANI, R. ; GAMBARI, R. ; MANFREDINI, Stefano. Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.23, n.1, p.264-271, 2015.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113–123, 2006.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*. v.15, p. 285-292, 2004.

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.

BOBIN, M.F.; RAYMOND, M; MARTINI, M.C. Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais.. *Cosmetics & Toiletries*, v. 7, p. 44-50, 1995.

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 69*, de 23 de março de 2016. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília.

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

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

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

CHERRAK, S.; MOKHTARI-SOULIMANE, N.; BERROUKECHE, F.; BENSENANE, B.; CHERBONNEI, A.; MERZOUK, H.; ELHABIRI, M. In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation, *PLoS ONE*, 2016.

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

COLIPA. In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products. Guidelines. 2011.

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

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

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

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

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

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada.* v.28, p.241-249, 2008.

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

GALLEANO, M. ; VERSTRAETEN, S. V. ;OTEIZA, P. I. ;FRAGA, C. G. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 501, p. 23-30 , 2010.

GANESHPURKAR, A. ; SALUJA, A. K. ; The Pharmacological Potential of Rutin, *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.25, n.2, p.149-164, 2017.

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.

GILALBERTE, Y., GONZALES, S., 2010. Update on photoprotection. *Actas Dermosifiliogr.* 101, 659-672

GOMES, L.J.; GOMES, M.A.O. Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava-d'anta. *Ciência Hoje*, v.27, n.161, p.66-9, 2000.)

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, v.56, n.9, p.683-687, 2001.

HAN, R. M.; ZHANG, J. P.; SKIBSTED, L. H. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules*, v. 17, p. 2140–2160, 2012.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, n.6, p.481-504, 2000.

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

INCA, Instituto Nacional Do Câncer José Alencar Gomes Da Silva. *Tipos de Câncer*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>. Acesso em: 12 jun. 2015.

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

KAMEL, R. ; MOSTAFA, D. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.153, n.12, p.59-66, 2015.

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

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 53, p. 181–192, 1999.

LADEMANN, J.; JACOBI, U.; SURBER, C. WEIGMANN, H. J.; FLUHR, J. W. 2009. The Tape Stripping Procedure - Evaluation of Some Critical Parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 72, p. 317–323, 2009.

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

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

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonoides: farmacologia dos flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano 3, n.17, 2000.

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

MAIER, T.; KORTING, H.C.; Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol*. V. 18, p. 253-62, 2005.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of dermatological science*, v. 58, p. 85–90, 2010.

MATSUI, M.S.; HSIA, A.; MILLER, J.D.; HANNEMAN, K.; SCULL, H.; COOPER, K.D.; BARON, G. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. *J Inest Derm Symp P*, v.14, p.56-59, 2009.

MYDLARZ, W.K. ; WEBER, R. S. ; KUPFERMAN, M.E. Cutaneous malignancy of the head and neck. *Surg Oncol Clin*, v.24, p.593-613, 2015.

NICHOLS, Joi A.; KATIYAR, Santosh K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 2010.

OLIVEIRA, C.A.; PERES, D. D'A.;RUGNO, C.M.;KOJIMA,M.;PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI,V.O.;KANEKO,T.M.;ROSADO,C.;MOTA,J.;VELASCO,M.V.R.;B ABY, A.R.Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*,v.148, p.154-159, 2015.

OLIVEIRA, C.A. Desenvolvimento, avaliação da segurança e eficácia clínica de sistemas nanoparticulados de gelatina contendo rutina. 2015. 157 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

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

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. 127 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

PEDRIALI, C. A. 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 físicos. 2012. 210 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

PELIZZO, M.; ZATTRA, E.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; GAROLI, D.; ALAIBAC, M.; *In vitro* evaluation os sunscreens: an update for the clinicians, *International Scholarly Research Network ISRN Dermatology*, v.2012, p. 1-4, 2012.

PERES, D. A.. Ácido ferúlico em protetores solares: desenvolvimento e eficácia multifuncional *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. 2015. 210 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015

PHARMASPECIAL,<http://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/4_lit_ari_stoflex_avc.pdf >; acessado em 12 de Junho de 2017.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINNAGODA, J.; TUNKER, R.A.;AGNER, T.; SERUN, J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European society of Contact Dermatitis. *Contact Deratitis*, v.22, 164-178p, 1990.

RADICE, M.; MANFREDINI, S; ZIOSI, P.; DISSETTE, V.; BUSO, P.; FALLACARA, A.; VERTUANI, S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review, *Fitoterapia*, v.114, p. 144–162, 2016.

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

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTE, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.175, n.1, p.85-94, 1998.

SCHALKA S.; STEINER, D.; RAVELLI F; STEINER, T.; TERENA, A.; Marçon MARCON, C.; AYRES, E.; ADDOR, F.; MIOT, H.; PONZIO, H.; DUARTE, I.; NEFFÁ, J.; DA CUNHA, J.; BOZA, J.; SAMORANO, L.; CORRÊA, M.; MAIA, M.; NASSER, N.; LEITE, O.; LOPES, O.; OLIVEIRA, P.; MEYER, R.; CESTARI, T.; DOS REIS, V.; REGO, V. Consenso Brasileiro de Fotoproteção, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89 n.6, s.1, p. 1-74, 2014.

SCHALKA, S; REIS, V. Fator de proteção solar: significado e controvérsias, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.86, n.3, p.507-515, 2011.

SCHLUMPF, M.; SCHMID, P.; DURRER, S.; CONSCIENCE, M.; MAERKEL, K.; HENSELER, M.; GRUETTER, M.; HERZOG, I.; REOLON, S.; CECCATELLI, R.; FAASS, O.; STUTZ, E.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity cosmetic UV filters: an update. *Toxicology*, v.205, n.1/2, p.113-122, 2004.

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

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

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*, v.133, p.1202-1205, 2009.

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

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

STEVANATO, R; BERTELLE, M; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.69, n.1, p.71-77, 2014.

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

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR part 352. Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Disponível em: <
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=352.10>> Acessado em 21 de abril de 2017.

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 pmetoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Latin America Journal of Pharmacy*, v.27, n.1, p.23-27, 2008a.

VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*, v.363, n.1/2, p.50-57, 2008b.

VIOLANTE, I. M. P.; DOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R.A. N.; FERRARI, M. Estudo preliminar da atividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 89, p.175-179, 2008.

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

YANG, J. ; GUOA, J. ;YUANB, J. In vitro antioxidant properties of rutin. *College of Life Science*, v.44 p.1060 -1066, 2008

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

ANEXOS

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo B: Currículo Lattes – Letícia Costa Tomazelli

Letícia Costa Tomazelli

- Endereço para acessar este CV:<http://lattes.cnpq.br/3857481948866148>
- Última atualização do currículo em 05/07/2017

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (2012). Foi aluna de Iniciação Científica sob orientação da Profa. Dra. Carlota Rangel-Yagui na FCF-USP com o projeto " Síntese do fármaco miltefosina e estudo de sua atividade antichagásiga"- Bolsista FAPESP Processo: 08/08491-5. Têm experiência na área de Pesquisa e Desenvolvimento de novas formulações cosméticas, tendo trabalhado na Colgate-Palmolive e na Avon Cosméticos como estagiária e Analista de Pesquisa e Desenvolvimento durante o período de graduação. Em 2011 participou de um processo seletivo da CCint-USP para estudar no exterior e recebeu bolsa de estudos para estudar na Universidade de Montréal - Canadá durante o segundo semestre de 2011 e início de 2012, período em que se especializou em Química de Desenvolvimento e estagiou no laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade. Atualmente trabalha em empresa multinacional Sinclair Pharma como Diretora de Operações, gerenciando as áreas de Marketing e Comercial.
(Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

2007 - 2012 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2012

Formação complementar

2011 - 2012 Extensão universitária em Baccalauréat en Chimie.
Université de Montreal, UdeM, Montreal, Canadá

Atuação profissional

1. Sinclair Pharma Brazil - SINCLAIR PHARMA

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Diretora de Operações , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2. Estheticare Beauty Solutions - EBS

Vínculo institucional

2012 - 2016 Enquadramento funcional: Farmacêutica, Regime: Parcial

3. Avon Cosméticos - AVON

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Pesquisa e Desenvolvimento , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:
Analista de Pesquisa e Desenvolvimento de fórmulas cosméticas com ênfase em Maquiagem e Skin Care.

2010 - 2010 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiária de Pesquisa e Desenvolvimento de Fórmulas.

4. Colgate Palmolive Ind. e Com. Ltda - COLGATE

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiária na área de Pesquisa e Desenvolvimento Analítico.

5. Université de Montreal - UdeM

Vínculo institucional

2011 - 2012 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio no Departamento de farmacotécnica da Faculdade de farmácia da Universidade de Montréal : Desenvolvimento de oral strips contendo nanopartículas de Nistatina para o tratamento de candidíase oral em crianças sob orientação do Prof. Dr. Grégoire Leclair.

6. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiária na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, na área de Fármacos e Medicamentos, setor de Planejamento de Fármacos. Bolsista FAPESP com o projeto "Síntese do fármaco Miltefosina e estudo de sua atividade antichagásica" realizado sob orientação da Prof. Dra. Carlota Rangel Yagui.

Áreas de atuação

1. Farmacotécnica e tecnologia farmacêutica
2. Cosmetologia
3. Desenvolvimento de formulações cosméticas

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Francês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TANABE, C. A. Y.; PACHIONI, J. A.; **TOMAZELLI, L. C.**; RANGEL-YAGUI, C. O. Synthesis of the chemotherapeutic agent miltefosine In: II International Symposium on Drug Discovery., 2011, Araraquara. **Abstract Book.** , 2011.
2. TANABE, C. A. Y.; SHERGUE, E. M.; **TOMAZELLI, L. C.**; RANGEL-YAGUI, C. O. Synthesis of the chemotherapeutic agent miltefosine In: Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, 2010, São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** , 2010. v.46.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **Seminário da Comissão de Pesquisa FCF-USP, 2013.** (Seminário)
Cosméticos do ponto de vista funcional: impacto da nova regulamentação europeia sobre os players do mercado.
2. Apresentação (Outras Formas) no(a)**Desenvolvimento de formulações com foco em maquiagem**, 2011. (Oficina)
FCF-USP.
3. Apresentação (Outras Formas) no(a)**Seminário da Comissão de Pesquisa FCF-USP, 2009.**
(Seminário)
RMN aplicada ao controle de qualidade de fármacos.
4. Apresentação (Outras Formas) no(a)**Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas**, 2009. (Simpósio)
Fronteiras do conhecimento.

Anexo C: Ficha do Aluno – Letícia Costa Tomazelli



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 5926287/1 - Letícia Costa Tomazelli

Email: leticia.tomazelli@usp.br
Data de Nascimento: 29/09/1988
Cédula de Identidade: RG - 35.007.612-1 - SP
Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 11/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 11/07/2013
Data Limite para o Depósito: 11/07/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 11/07/2013 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 11/07/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 21/09/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 11/07/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 30/01/2017

Impresso em: 05/07/2017 10:52:47

Janus

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 5926287/1 - Letícia Costa Tomazelli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred	Freq	Conc	Exc	Situação
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5811-1/1	Utilização de Sistemas Biológicos In Vitro, Ex Vivo e In Vivo na Avaliação de Eficácia e Segurança de Fármacos, Medicamentos e Cosméticos	17/02/2014	30/03/2014	30	2	80	A	N	Concluída
FBT5706-3/1	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	10/03/2014	11/05/2014	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5702-6/1	Formulação de Produtos Cosméticos e Cosmecêuticos	04/08/2014	07/09/2014	75	5	89	A	N	Concluída
FBF5706-7/2	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	06/10/2014	16/11/2014	60	0	0	R	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída

	Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas									
EAP5015-1/2	Marketing para Empreendedorismo (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	06/08/2015	27/11/2015	120	8	93	A	N	Concluída	
EAP5002-1/5	Administração Estratégica (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	04/08/2016	30/11/2016	120	8	80	A	N	Concluída	
FBF5779-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	10/03/2017	19/05/2017	90	6	89	A	N	Concluída	

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	38
Estágios:			
Total:	0	25	38

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 30/01/2017

Impresso em: 05/07/2017 10:52:47

 - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

FICHA DO ALUNO

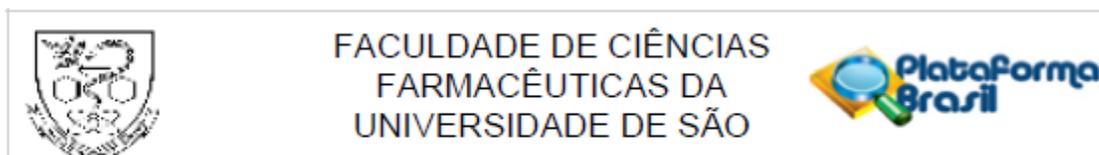
9139 - 5926287/1 - Leticia Costa Tomazelli

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

Última ocorrência: Matrícula Regular em 30/01/2017

Impresso em: 05/07/2017 10:52:47

Anexo D: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica

Pesquisador: André Rolim Baby

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42095415.3.0000.0067

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.421.928

Apresentação do Projeto:

O presente projeto foi inicialmente apreciado em reunião do CEP em março de 2015 e posteriormente em reunião de junho de 2015. Nesta versão, o pesquisador apresentou as alterações recomendadas no respectivo parecer, conforme descrito em carta e apresentado nos TCLEs. A apresentação do projeto está abaixo e segue exatamente o primeiro parecer, uma vez que não houve alteração do projeto.

Apresentação do Projeto:

O presente projeto tem como proposta desenvolver e avaliar (in vitro e in vivo) protetores solares multifuncionais contendo rutina associada a filtros solares. Tal proposta se fundamenta na crescente necessidade de utilização de fotoprotetores por parte da população em função da conscientização quanto aos efeitos deletérios da radiação solar, entre eles o fotoenvelhecimento e o câncer de pele. Este fato, alinhado às inovações propostas pela Indústria Cosmética, tornou o uso de protetores solares parte integrante do dia-a-dia da população, seja em sua forma tradicional, ou associado a produtos cosméticos diversos, como maquiagens e hidratantes. Os filtros solares são substâncias capazes de absorver e refletir apenas uma parte da radiação ultravioleta que atinge a pele durante a exposição à radiação solar. Por este motivo, é fundamental

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.421.928

que para a obtenção de uma ação fotoprotetora efetiva, associem pelo menos dois tipos de filtros químicos (objetivando ampliar a absorção da radiação UV nos intervalos UVB e UVA), com compostos antioxidantes capazes de atuar na pele protegendo-a dos radicais livres formados durante a exposição. Esta combinação entre filtros UVA e UVB com compostos antioxidantes confere às formulações a característica de multifuncionalidade. Atualmente existe um crescente interesse no potencial fotoprotetor e antioxidante de substâncias bioativas, consideradas como alternativas seguras e eficazes para redução da concentração dos filtros solares sintéticos e incorporação da atividade antioxidante no produto. Entretanto, conforme descrito no projeto, a literatura científica envolvendo a incorporação de substâncias bioativas de origem natural em formas farmacêuticas de uso cosmético é escassa, em especial, os sistemas emulsionados. Apesar da disponibilidade de diferentes classes de filtros solares químicos, extratos vegetais e substâncias naturais isoladas, o mercado não dispõe de formulações fotoprotetoras possuindo associações de filtros solares químicos com flavonoides isolados de eficácia comprovada. Dentre os compostos naturais diversos utilizados em formulações cosméticas, os flavonoides apresentam propriedades funcionais que favoreceriam o seu uso em fotoprotetores. A rutina é um flavonoide que tem se destacado como substância bioativa já utilizada na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar que faz parte da biodiversidade brasileira e que é extraída da Fava d'anta, espécie responsável pela produção de 50% do composto no mundo. Assim, diante do exposto, este projeto de pesquisa tem como principal objetivo o desenvolvimento e a avaliação de formulações fotoprotetoras associadas a rutina. Os filtros solares octil dimetil PABA e avobenzona, considerados de elevada segurança e utilizados há muitos anos em produtos cosméticos, serão combinados ao composto bioativo rutina. A primeira etapa do projeto envolve o desenvolvimento de 8 formulações fotoprotetoras na forma de emulsão, combinando diferentes concentrações dos compostos ativos (filtros solares) e bioativos (rutina). Em seguida, estas formulações terão suas características físico-químicas (aspecto, cor, odor, valor de pH e viscosidade aparente) e funcionais (atividade antioxidante in vitro, Fator de Proteção Solar - FPS estimado in vitro e fator de proteção solar UVA) determinadas. Finalizados estes testes, será realizado o teste de permeação cutânea in vitro em modelo de células de difusão para avaliação de segurança das formulações antes de se iniciarem os testes clínicos. A partir desta etapa, apenas as 4 formulações de melhor desempenho serão testadas por meio dos testes in vivo. Para este estudo, serão selecionados um total de 155 voluntários, sendo 95 participantes para a execução dos seguintes ensaios de segurança in vivo: irritação cutânea primária, irritação cutânea

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.421.928

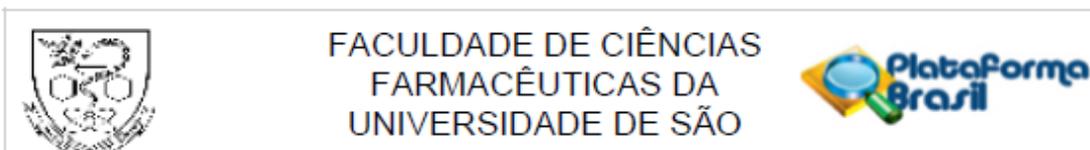
acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização, conforme preconizado nos guias e legislações internacionais de segurança de produtos cosméticos. Adicionalmente, 60 participantes serão selecionados para realização dos seguintes ensaios de eficácia: Fator de proteção solar in vivo, Hidratação superficial da pele e atividade antioxidante da pele ex vivo. A inclusão de cada participante aos estudos de eficácia e segurança in vivo se dará por meio de critérios de inclusão e exclusão previamente definidos e descritos no projeto, além do entendimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, mantendo-se o anonimato do participante e garantindo a sua saída do estudo, voluntariamente, a qualquer momento. Os ensaios in vitro, ex vivo e in vivo serão conduzidos na empresa IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada e na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com acompanhamento dos participantes por uma médica dermatologista e por um pesquisador vinculado à instituição universitária, durante todas as etapas do estudo. Por meio dos resultados desta pesquisa, espera-se comprovar a segurança e a eficácia das formulações fotoprotetoras multifuncionais desenvolvidas.

Objetivo da Pesquisa:

A proposta do projeto envolve o desenvolvimento de oito sistemas fotoprotetores multifuncionais, contendo o composto bioativo rutina associada a dois filtros solares, octil dimetil PABA (filtro com proteção contra a radiação UVB) e avobenzona (filtro com proteção contra as radiações UVA). Os objetivos do projeto serão os seguintes:

- (i) Preparo e avaliação da estabilidade preliminar de fotoprotetores bioativos multifuncionais compostos por octil dimetil PABA (filtro orgânico UVB), avobenzona (filtro orgânico UVA) e rutina (composto bioativo), associados ou não;
- (ii) Caracterização física e físico-química das formulações;
- (iii) Determinação da atividade antirradicalar in vitro das preparações;
- (iv) Avaliação da eficácia fotoprotetora in vitro;
- (v) Estimativa da segurança in vitro das formulações;
- (iv) Avaliação da segurança das 4 formulações de melhor desempenho in vivo, por meio dos ensaios de irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização;
- (vi) Avaliação do potencial antioxidante da epiderme (inibição da formação de radicais livres e da oxidação de lipídeos) promovida pelas 4 formulações de melhor desempenho;
- (vii) Determinação da eficácia clínica das 4 formulações antissolares de melhor desempenho por

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 1.421.928

meio da obtenção do fator de proteção solar (FPS) estático e da hidratação superficial da pele.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos, consta descrito no projeto que todas as matérias-primas selecionadas para as formulações são referenciadas, aprovadas para uso tópico nas concentrações propostas e reconhecidamente seguras. Adicionalmente, as formulações serão preparadas seguindo as Boas Práticas de Fabricação e Controle. Entretanto, como qualquer produto cosmético, poderá causar reações inesperadas como irritação, inchaço, coceira e ardor nos locais de aplicação. O pesquisador garante que qualquer reação adversa provocada pelo produto em teste ou procedimentos realizados será acompanhada pelos responsáveis pelo projeto (incluindo médico dermatologista), com fornecimento de suporte e esclarecimentos aos participantes, garantindo sua saúde, segurança e bem-estar pleno. Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que garantirá à comunidade um produto seguro e eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme exposto no item "Apresentação do Projeto", o mesmo contemplará as etapas de desenvolvimento de 8 formulações de fotoprotetores multifuncionais, contendo o composto bioativo rutina associada a dois filtros solares; caracterização e avaliação *in vitro* destas formulações; seleção de 04 formulações que apresentaram melhor desempenho *in vitro* e avaliação destas por meio de ensaios *in vivo* com a participação de voluntários. Para o estudo *in vivo*, serão selecionados o total de 155 voluntários, sendo 95 participantes para a execução dos ensaios de segurança *in vivo* (irritação cutânea primária, irritação cutânea acumulada, sensibilização dérmica, fotoirritação e fotossensibilização), conforme preconizado nos guias e legislações internacionais de segurança de produtos cosméticos. Adicionalmente, 60 participantes serão selecionados para realização dos seguintes ensaios de eficácia (Fator de proteção solar *in vivo*, Hidratação superficial da pele e atividade antioxidante da pele *ex vivo*). Os critérios de inclusão e exclusão estão descritos no projeto. Destaca-se que para a inclusão, os voluntários deverão apresentar as seguintes características: (i) participantes saudáveis; (ii) ambos os sexos; (iii) idade entre 18 e 60 anos; (iv) pele íntegra na região de teste; (v) concordância em aderir aos procedimentos do estudo, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Encontra-se descrito nesta versão do projeto que todos os ensaios *in vivo*, com exceção do Tape Stripping *ex vivo*, serão realizados no IPclin – Instituto de Pesquisas Clínicas Integradas, localizado

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.421.928

em Jundiaí-SP (este instituto presta serviço em pesquisa clínica, com realização de testes de segurança e eficácia de produtos cosméticos). O ensaio Tape Stripping ex vivo será realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os ensaios in vivo estão detalhadamente descritos, incluindo os esclarecimentos quanto ao local (e condições) onde serão realizados os ensaios in vivo; a forma como serão recrutados os voluntários e como eles serão acompanhados no estudo. Em relação às formulações a serem desenvolvidas, também foram indicadas no projeto a origem da rotina e como se dará a sua utilização nas formulações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme descrito em pareceres anteriores, este estudo envolve a participação total de 155 voluntários; não é um estudo multicêntrico; a Folha de Rosto está corretamente preenchida; há a descrição da equipe (pesquisador responsável; pós-graduando e o médico dermatologista) e das atribuições de cada colaborador; as declarações de participação dos

colaboradores estão anexas ao processo; foram apresentadas as declarações de anuência do Departamento de Farmácia da FCF/USP e do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, onde serão realizados os estudos in vivo; os currículos do pesquisador responsável, da médica (pesquisadora colaboradora) e da aluna da pós-graduação (incluído nesta versão) constam na Plataforma Lattes e demonstram competências para a realização do projeto.

Os TCLEs apresentados foram devidamente readequados, conforme a seguir:

Recomendação 1 - No TCLE de "Avaliação da hidratação da pele" - esclarecer para o voluntário da pesquisa se será fornecida alguma refeição, uma vez que este permanecerá por nove horas no local para o ensaio.

Resposta: Sim, será oferecida refeição. Esta informação foi incluída no TCLE "Avaliação da hidratação da pele NOVO MODELO" e encontra-se em destaque em amarelo para fácil consulta.

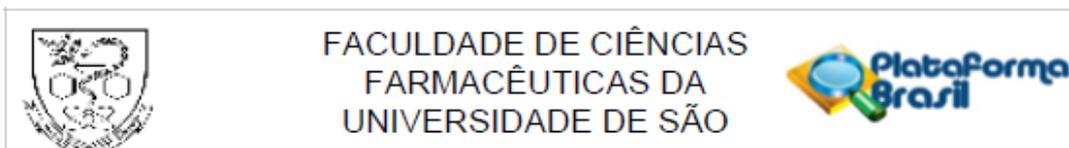
Recomendação 2 - No TCLE de "Avaliação da atividade antioxidante" - esclarecer para o voluntário o significado de "desconforto mínimo" provocado pelos ensaios com as fitas adesivas.

Resposta: O "desconforto mínimo" foi caracterizado pelo pesquisador como "semelhante a retirada de um band-aid da pele" e a descrição foi incluída no TCLE "Avaliação da atividade antioxidante NOVO MODELO" e grifada em amarelo.

Recomendação 3 - Nos TCLE de "Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS)" e "Avaliação da fotoirritação e fotossensibilização cutânea" - esclarecer para o voluntário o significado de "desconforto mínimo" em relação à aplicação da radiação que simula a radiação solar.

Resposta: O "desconforto mínimo" foi caracterizado pelo pesquisador como "semelhante ao

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 1.421.928

contato com uma superfície quente durante poucos minutos” e a descrição foi incluída em ambos TCLE’s “Avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) NOVO MODELO” e “Avaliação da fotoirritação e fotossensibilização cutânea NOVO MODELO” e grifada em amarelo para fácil consulta.

Recomendação 4 - Esclarecer e, se for o caso, corrigir os TCLEs, informando inclusive quem se responsabilizará pelo atendimento dos voluntários em São Paulo, durante 24 horas, todos os dias, inclusive feriados e fins de semana, no caso de alguma intercorrência, do mesmo modo que está descrito para os participantes residentes em Jundiaí.

Resposta: Conforme informação do pesquisador, o único teste que será realizado na cidade de São Paulo, no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP é o da “Atividade antioxidante”. Durante este teste, o pesquisador responsável Prof. Dr. André Rolim Baby e a pesquisadora associada Letícia Costa Tomazelli serão responsáveis por prestar atendimento em casos de intercorrências, encaminhando e acompanhando os voluntários ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Os pesquisadores estarão disponíveis durante 24 horas, todos os dias, inclusive feriados e fins de semana. Tal informação foi incluída na versão do TCLE: “Avaliação da atividade antioxidante NOVO MODELO”.

Recomendação 5 - O TCLE deve seguir o modelo disponível na secretaria do CEP

Resposta: Todos os TCLEs foram readequados ao modelo disponível na secretaria do CEP, sendo nomeados na plataforma Brasil com a terminação “NOVO MODELO”.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências. Todas as recomendações feitas no parecer anterior foram acatadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_466581.pdf	13/01/2016 15:08:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Carta_resposta_ao_comite_de_etica.pdf	13/01/2016 15:01:42	André Rolim Baby	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.421.928

Ausência	Carta_resposta_ao_comite_de_etica.pdf	13/01/2016 15:01:42	André Rolim Baby	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Hidratacao_da_Pele_NOVO_MO DELO.doc	13/01/2016 14:53:19	André Rolim Baby	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Fotossensibilizacao_e_Fotoirritacao_NOVO_MODELO.doc	13/01/2016 14:52:25	André Rolim Baby	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Fator_de_Protecao_Solar_NOVO_MODELO.doc	13/01/2016 14:51:41	André Rolim Baby	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Atividade_Antioxidante_da_Pele_NOVO_MODELO.doc	13/01/2016 14:50:31	André Rolim Baby	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_466581.pdf	22/04/2015 23:50:37		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Leticia Costa Tomazelli).pdf	22/04/2015 23:48:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO COMPLETO PARA COMITÊ DE ÉTICA - VERSÃO 2.pdf	22/04/2015 23:47:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_466581.pdf	23/02/2015 16:14:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	[2014.05.20] TCLE - Irritação Cutânea Primária, Irritação Cutânea Acumulada e Sensibilização Dérmica.doc	23/02/2015 16:12:01		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO.pdf	23/02/2015 16:10:31		Aceito
Outros	Descrição da Equipe de Pesquisa.pdf	18/02/2015 16:33:37		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO (Leticia Tomazelli Yoshida).pdf	18/02/2015 16:33:21		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO (DRA. LEILA BLOCH).pdf	18/02/2015 16:33:08		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE (IPCLIN).pdf	18/02/2015 16:32:58		Aceito
Outros	DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO DEPARTAMENTO (FCF-USP).pdf	18/02/2015 16:32:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.421.928

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 24 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

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



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

1. Informações do Participante da Pesquisa (para preenchimento)

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

2. Dados sobre a Pesquisa

Título da Pesquisa: Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica

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

Pesquisador Associado: Letícia Costa Tomazelli Yoshida / fone: (11) 3091-2358 e (11) 99170-1910
 - Pesquisadora da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas)

Médico Dermatologista: Dra. Leila David Bloch / fone: (11) 2609-2000 e (11) 97030-2777
 - Diretora Médica do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Duração da Pesquisa: 5 semanas Risco da Pesquisa: Mínimo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista, durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Pierre Curie, 520, Jardim da Saúde, São Paulo, CEP: 04290-050, telefone: (11) 2609-2000 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Complexo Hospitalar Heliópolis (Rua Cônego Xavier, 276, Sacomã, São Paulo, CEP: 04231-030, telefone: (11) 2067-0300), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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



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

Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

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

Anexo F: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o ensaio de Fotossensibilização e Fotoirritação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica
--

4. Duração da Pesquisa

21 DIAS

5. Nome do Pesquisador Responsável

Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033	
Cargo/ Função: Professor, Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas).	Nº de registro do Conselho Regional: CRF-SP 30976

6. Instituição/Instituições

IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada
--

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o potencial irritante e/ou alergênico de produtos cosméticos fotoprotetores, após exposição à fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assinie-



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao Instituto de Pesquisa em dias pré-estabelecidos, durante cinco semanas. No total, será necessário que você compareça ao local de estudo em 21 dias. 18 dias consecutivos (sem contar os domingos) e mais 3 dias consecutivos após um período de repouso de 10 dias. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica de sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo pequeno, de cerca de 1cm², contendo o(s) produto(s) em teste, em suas costas.

Após 24 horas de contato do(s) produto(s) com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo. Após 30 minutos da retirada do adesivo, a área de aplicação dos produtos será exposta a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar UVA (320-400nm) por cerca de 6 minutos e 40 segundos. A energia desta fonte, corresponderá a uma exposição por este tempo ao sol em um dia ensolarado. Por se tratar de um tempo pequeno, o desconforto será mínimo, semelhante ao contato com uma superfície quente durante poucos minutos. A leitura das áreas de suas costas expostas ao(s) produto(s) será realizada 24 horas após a etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotirritação primária.

Por se tratar de um período pequeno de realização de testes, não será necessário realizar refeições no local de realização da pesquisa.

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

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

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

Finalmente, após 24 horas de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar. A leitura das áreas de suas costas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

expostas ao(s) produto(s) será realizada 24 horas após a última etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotossensibilização.

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

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

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Pierre Curie, 520, Jardim da Saúde, São Paulo, CEP: 04290-050, telefone: (11) 2609-2000 ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Complexo Hospitalar Heliópolis (Rua Cônego Xavier, 276, Sacomã, São Paulo, CEP: 04231-030, telefone: (11) 2067-0300), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

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

Anexo G: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o ensaio de Hidratação Cutânea



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, octil dimetil PABA e avobenzona; caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica

4. Duração da Pesquisa

2 DIAS (9 horas no primeiro dia e 1 hora no segundo)
--

5. Nome do Pesquisador Responsável

Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033	
Cargo/ Função: Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas).	Nº de registro do Conselho Regional: CRF-SP 30976

6. Instituição/Instituições

IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada
--

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a hidratação da pele após a aplicação de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas, surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

Para a realização deste estudo, você comparecerá ao local da pesquisa dois dias consecutivos, permanecendo no local por um período de nove horas no primeiro dia e 1 hora no segundo.

No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele. Se você atender aos requisitos para o estudo, você ficará durante 30 minutos em uma sala gelada, com temperatura e umidade relativa do ar, a $20,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e $45,0 \pm 5,0\%$, respectivamente, e então será feita uma leitura inicial no seu antebraço com a sonda de um equipamento. Esta medição é feita encostando o equipamento na região a ser medida por alguns segundos e não causará nenhum tipo de desconforto. Após esta leitura, os produtos serão aplicados em uma região do antebraço e novas medidas serão feitas após 2, 4 e 8h. Após esta etapa, você será orientado sobre o horário que deverá comparecer no próximo dia e poderá deixar as dependências do local da pesquisa. Durante o período de permanência na instituição, será oferecida refeição.

No segundo dia, a última medição será realizada (24 horas após a aplicação do produto) e após esta etapa, você poderá deixar as dependências do local da pesquisa definitivamente. Os resultados obtidos através do equipamento serão posteriormente avaliados, por pesquisadores treinados, para determinação da hidratação natural da pele (leitura inicial) e também da hidratação da pele após tratamento com o(s) fotoprotetor(es) (áreas de aplicação).

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

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

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin, Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Evandro César Gnaccarini, 235 - Vila das Hortências - Jundiaí/SP. CEP: 13209-410. Tel: (11) 4087-0093 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o **Hospital Santa Elisa** (Rua Sócrates Fernandes de Oliveira, 70,



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Chácara Urbana, Jundiaí / SP, CEP: 13201-838, telefone: (11) 4583-4444, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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

Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

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

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



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Fotoprotetores bioativos multifuncionais contendo rutina, ~~octil dimetil PABA~~ e ~~avobenazona~~: caracterização físico-química, funcional e eficácia clínica

4. Duração da Pesquisa

2 DIAS

5. Nome do Pesquisador Responsável

Dr. André Rolim Baby / fone: (11) 3091-2358 e (11) 94225-0033	
Cargo/ Função: Professor Doutor da Universidade de São Paulo (Faculdade de Ciências Farmacêuticas).	Nº de registro do Conselho Regional: CRF-SP 30976

6. Instituição/Instituições

IPclin, Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o Fator de Proteção Solar (FPS) de produtos cosméticos fotoprotetores. Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

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

Após 20 minutos da aplicação, a área contendo o(s) produto(s) em teste será exposta a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar (UVB) emitida pelo sol em um dia ensolarado. Adicionalmente, uma área virgem de suas costas (não utilizada para a aplicação do(s) produto(s) em teste) será utilizada como controle do estudo, e também será exposta à fonte emissora de luz, que reproduz a radiação solar. A intensidade desta radiação será aumentada em progressão geométrica e este ensaio terá duração de alguns minutos apenas, causando desconforto mínimo, semelhante ao contato com uma superfície quente durante poucos minutos. Por se tratar de um teste de curta duração, não será necessário que você realize refeições no local do estudo.

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

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

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

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores e médico dermatologista, durante todas as etapas do estudo. Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com o **IPclin, Instituto de Pesquisa Clínica Integrada**: Rua Pierre Curie, 520, Jardim da Saúde, São Paulo, CEP: 04290-050, telefone: (11) 2609-2000 (horário comercial) ou (11) 97030-2777 (contato de emergência disponível 24 horas).

Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

acompanharão até o Complexo Hospitalar Heliópolis (Rua Cônego Xavier, 276, Sacomã, São Paulo, CEP: 04231-030, telefone: (11) 2067-0300), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário. Garantimos que todas as despesas decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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

Consentimento Pós-Esclarecido

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São**



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000,
Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.