UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CELIA MARIA VARGAS DA COSTA BUZZO

FOTOPROTETORES – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO EM MODELO ANIMAL

CAMPINA GRANDE

2016

CELIA MARIA VARGAS DA COSTA BUZZO

FOTOPROTETORES – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO EM MODELO ANIMAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva

CAMPINA GRANDE

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

B992f Buzzo, Célia Maria Vargas da Costa.
Fotoprotetores [manuscrito] : otimização do processo de desenvolvimento, caracterização, estudo de estabilidade e avaliação em modelo animal / Célia Maria Vargas da Costa Buzzo. - 2016.
138 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, Departamento de Farmácia".

1. Fotoprotetores. 2. Filtros solares. 3. Emulsionantes. 4. Célula de queimadura solar. 5. Apoptose. I. Título.
21. ed. CDD 615.7

CELIA MARIA VARGAS DA COSTA BUZZO

FOTOPROTETORES – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO EM MODELO ANIMAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

APROVADODO EM 25 DE AGOSTO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Alexsandro da Silva
Orientador

Profª Drª Elisana Afonso de Moura Pires
Membro Externo

Prof. Dr. Toshiyuki Nagashima Júnior
Membro Interno

Aos meus pais (*in memorian*),

José Oliveiro da Costa e Julia Vargas Oliveiro da Costa,

pelo amor, pelo exemplo de caráter e honestidade.

A meu marido Aluizio, pelo total apoio e abnegação.

Aos meus filhos Thiago e Murilo, por torcerem sempre por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha saúde e disposição para o trabalho e motivação para o aprendizado.

Aos meus pais, que apesar de sua simplicidade sempre valorizaram os estudos e me guiaram sempre no caminho do saber.

Ao meu marido Aluizio, pelo apoio total, pela compreensão por minhas ausências e por ser testemunha paciente desta trajetória.

Aos meus filhos queridos, Thiago e Murilo, pelas palavras de apoio e incentivo ao longo desta jornada, que fique o legado da busca constante pelo conhecimento.

A Pollianne Barbosa da Silva, pelo apoio e incentivo e especialmente por cuidar com tanta dedicação da Dilecta em todas as minhas ausências.

A Dilecta, por me permitir realizar esta etapa tão importante em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Alexsandro da Silva, por me aceitar como orientanda, por me oferecer uma oportunidade de conhecimento ímpar, pela paciência e dedicação ao meu trabalho.

A João Walter Silveira, por me ensinar com tanta sabedoria e entusiasmo os caminhos dos testes em animais.

A amiga Alessandra Apolinário, por me abrir as portas do laboratório e me mostrar os primeiros passos do meu trabalho, por sua alegria, pelo seu exemplo de dedicação e coragem.

As alunas de iniciação científica Salete Rodrigues, Thayse Medeiros, Camila Melo, Sonaly Albino, Isis Valeska Lins, por tantas horas de dedicação e trabalho, pelo convívio harmonioso e prazeroso.

Ao Professor Doutor Fábio Santos de Souza, e ao grupo de pesquisa LUDEM, por tão gentilmente disponibilizar a infraestrutura do laboratório e recursos humanos qualificados para o meu trabalho.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É tempo de travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado sempre à margem de nós mesmos !" (FERNANDO PESSOA)

RESUMO

A importância do uso de fotoprotetores eficazes e seguros é uma realidade indiscutível, sendo necessário que os formuladores detenham conhecimentos técnico e cientifico suficientes para ultrapassar as barreiras comerciais. Com esse propósito foi conduzido o presente estudo que utilizou o planejamento fatorial na otimização de processos a fim de obter uma formulação estável de fator de proteção solar (FPS) de média proteção, com ação contra danos dérmicos induzidos pela radiação UV. Para avaliar a influência das variáveis independentes (tipo de cera, emoliente e agente modificador de sensorial) sobre as variáveis dependentes (pH, tamanho de gotículas, condutividade, espalhabilidade, viscosidade e FPS), elaborou-se um planejamento fatorial 2^3 com 8 formulações, as quais foram caracterizadas em relação aos parâmetros organolépticos e físico-químicos. Os resultados mostraram que as variáveis pH, condutividade e viscosidade apresentaram correlação por análise de variância (ANOVA). Ao confrontar todas as correlações fatores – resposta, as formulações selecionadas para o estudo de estabilidade foram F1, F2 e F5. Os resultados de estabilidade revelaram que F1 apresentou diferença significativa para viscosidade (T90 - ambiente), F2 para viscosidade (T60 - ambiente e geladeira) e F5 para pH (T90 - ambiente e luz ultravioleta). Para fins de registro, foi dada continuidade às pesquisas com os testes de segurança exigidos pela Anvisa na formulação F1 em virtude de possuir menor custo. Foram utilizados 30 camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos adultos alojados sob temperatura controlada ciclo claro/escuro de 12/12h, com ração padrão e água *ad libitum*. Os animais receberam irradiação UVB provinda de uma lâmpada Philips® TL 40W/12 RS, sendo divididos em seis grupos (n=5). Após serem sacrificados foram obtidos cortes histológicos da epiderme corados com hematoxilina-eosina (HE), sendo avaliada a espessura, o número de camadas de células nucleadas e o número de células de queimadura solar da epiderme, bem como a presença de infiltrado inflamatório na região subepidérmica de cada animal. Os resultados histopatológicos demonstraram que a formulação escolhida amenizou as alterações histopatológicas da pele, com redução do número de células de queimadura solar, do número de camadas de células nucleadas na epiderme e ausência de infiltrado inflamatório na região subepidérmica, obtendo o efeito protetor esperado. Ao final o objetivo do estudo foi atingido provando ser um trabalho de grande relevância e respaldo científico, desenvolvido por planejamento fatorial, ferramenta pouco utilizada na área de cosmetologia.

Palavras-chave: Fotoprotetores. Planejamento fatorial. Otimização. Estabilidade. Célula de queimadura solar. Apoptose

ABSTRACT

The importance of using effective and safe sunscreens is an undeniable reality, requiring formulators to obtain enough technical and scientific knowledge to overcome trade barriers. For this purpose was conducted this study using factorial design in the optimization of processes in order to achieve a stable formulation of a sun protection factor (SPF) of medium protection, with action against dermal damage induced by UV radiation. To evaluate the influence of the independent variables (type of wax, emollient and sensory modifier) on the dependent variables (pH, droplet size, conductivity, spreadability, stickiness and FPS), it was elaborated a factorial design 2^3 with 8 formulations, which were characterized in relation to the organoleptic and physico-chemical parameters. The results showed that the variables pH, conductivity and viscosity correlated by analysis of variance (ANOVA). Confronting all correlation factors - response, the formulations selected for stability study were F1, F2 and F5. The stability results revealed that F1 significant difference for viscosity (T90 - environment), F2 for viscosity (T60 - environment and refrigerator) and F5 to pH (T90 - environment and ultraviolet light). For registration purposes, it was continued the research on the safety testing required by Anvisa in F1 formulation due to have lower cost. 30 Swiss mice were used (Mus musculus), adult males housed under temperature controlled light / dark cycle of 12 / 12h with standard food and water ad libitum. Animals received UVB irradiation stemmed from a Philips® TL 40W lamp / 12 RS, divided into six groups (n = 5). After being sacrificed it was obtained histologic sections of skin stained with hematoxylin-eosin (HE) and measured the thickness of the skin layers and the number of nucleated cells for each animal. The histopathological results showed that the formulation chosen softened histopathologic skin changes with reduction of sunburn cells, the number of layers of nucleated cells in the epidermis and absence of inflammatory infiltrate in the subepidermal region, obtaining the expected protective effect. At the end the purpose of the study was achieved proving to be a very important work with scientific support, developed by factorial design, a not so used tool in cosmetology area.

Keywords: Photoprotector. Factorial Design. Optimization. Stability. Sunburn Cell. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Penetração do espectro solar na pele..... 27

FIGURA 2 - Índice de radiação Ultravioleta Máxima na América do Sul..... 28

FIGURA 3 – Efeitos Celulares da Apoptose..... 32

FIGURA 4 - Comparação histológica entre a pele jovem, cronoenvelhecida e fotoenvelhecida..... 34

FIGURA 5 - Classificação das Emulsões..... 36

FIGURA 6 - Fenômenos de instabilidade física em emulsões..... 43

FIGURA 7 - Estrutura química do "aluminium starch octenylsuccinate"..... 50

FIGURA 8 - Estruturas do Cocoate BG®..... 51

FIGURA 9 - Estrutura química do ácido behênico..... 52

FIGURA 10 – Estrutura do sorbitano..... 53

FIGURA 11- Valores preditos e observados da variável pH..... 66

FIGURA 12 - Gráfico de Pareto para variável pH..... 68

FIGURA 13 - Efeitos da Cera e Cocoate BG® no pH..... 69

FIGURA 14 - Efeitos da cera e Dry Flo® no pH..... 71

FIGURA 15 - Efeitos do Cocoate BG® e Dry Flo® no pH..... 73

FIGURA 16 - Valores preditos e observados para variável condutividade..... 76

FIGURA 17 - Gráfico de Pareto para variável condutividade..... 77

FIGURA 18 - Efeitos da Cera e Cocoate BG® na condutividade..... 78

FIGURA 19 - Efeitos da Cera e Dry Flo® na condutividade..... 80

FIGURA 20 - Efeitos do Dry Flo® e Cocoate BG® na condutividade..... 82

FIGURA 21 - Valores preditos e observados para variável viscosidade..... 88

FIGURA 22 - Gráfico de Pareto para variável viscosidade..... 89

FIGURA 23 - Efeitos da cera e Cocoate BG® na viscosidade..... 90

FIGURA 24 - Aparato de madeira com a lâmpada UV..... 103

FIGURA 25 - Medida da espessura da epiderme, número de camadas de células nucleadas da epiderme em pele de camundongo 24hs após a irradiação UV..... 105

FIGURA 26 - Células de queimadura solar na epiderme em pele de camundongo 24hs após a irradiação UV..... 106

FIGURA 27 - Infiltrado inflamatório subepidérmico em pele de camundongo 24hs após a irradiação UV..... 107
FIGURA 28 - Número de camadas de células de epiderme viável..... 111
FIGURA 29 - Espessura da epiderme viável..... 113
FIGURA 30 - Número de células de queimadura solar/100 células da epiderme viável..... 117
FIGURA 31 - Fotomicrografias- aspecto microscópico da epiderme..... 119
FIGURA 32 - Fotomicrografias - aspecto microscópico da derme..... 121

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 - Alterações cutâneas provocadas por envelhecimento intrínseco e extrínseco..... 30

TABELA 1 - Relação de filtros solares permitidos no Brasil e seus espectros de proteção..... 39

TABELA 2 - Comparação do Teste de Eficácia *In Vivo* segundo o órgão regulador..... 45

TABELA 3 - Valores Reais e os Níveis dos Fatores para o Planejamento Fatorial 2^3..... 57

TABELA 4 - Matriz do Planejamento Fatorial..... 57

TABELA 5 - Especificações das Formulações desenvolvidas por Planejamento Fatorial..... 58

TABELA 6 – Composição Quali-Quantitativa das Formulações..... 59

TABELA 7- Relação efeito eritemogênico (EE) e intensidade da radiação (I) conforme o comprimento de onda..... 62

TABELA 8- Variáveis respostas analisadas pelo Planejamento Fatorial (T0)..... 64

TABELA 9 - Análise de variância (ANOVA) para a variável respostas pH no T0..... 65

TABELA 10 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta condutividade no T0..... 75

TABELA 11 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta FPS no T0..... 84

TABELA 12 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta tamanho de gotícula no T0..... 85

TABELA 13 - Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta espalhabilidade no T0..... 86

TABELA 14 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta viscosidade no T0..... 87

TABELA 15 - Descrição das condições de armazenamento na estabilidade acelerada..... 95

TABELA 16 - Análise macroscópica das formulações submetidas a tempo zero e ciclo gelo/degelo..... 96

TABELA 17 - Variáveis respostas analisadas no tempo zero e ciclo gelo/degelo..... 97

TABELA 18 - Espessura da epiderme e número de camadas de células nucleadas em dorso de camundongos após exposição UVB de 2,87J/cm^2 em animais tratados e não tratados..... 110

TABELA 19 Número de células de queimadura solar para cada 100 células obtido após 24h da irradiação UV..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A/O - emulsão água em óleo

ASQ - "American Society for Quality"

COLIPA - "Comité de Liason des Associations Européenes de Industrie et de la Perfumerie"

cP - centipoise (unidade de viscosidade)

DEM - dose eritematosa mínima

DNA - ácido desoxirribonucleico

DTA - análise térmica diferencial

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EHL - Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo

FDA - "Food and Drug Administration"

FPS - fator de proteção solar

EROS - espécies reativas de oxigênio

GC-MS - cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massas

HE - Hematoxilina e Eosina

HPLC - "High-Performance Liquid Chromatography"

INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IUV - índice de ultravioleta

IM - intensamente modificada

LM - levemente modificada

M - modificada

$\mu S/cm^2$ - microsiemens/cm^2 (unidade de condutividade em água)

N - normal, sem alteração

O/A - emulsão óleo em água

ONG - organização não governamental

PABA - ácido para-amino benzoico

PVP - polivinilpirrolidona

PEG - polietilenoglicol

rcf - rotações centrífugas relativas (Força G)

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SBD - Sociedade Brasileira de Dermatologia

UV - radiação ultravioleta

UVA - comprimento de onda de 320-400 nm

UVB - comprimento de onda de 290-320 nm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 20

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS..... 23
2.1 Justificativa..... 23
2.2 Objetivo Geral..... 23
2.3 Objetivos Específicos..... 24

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 26
3.1 Radiação Ultravioleta (UV)..... 26
3.2 Principais efeitos da radiação solar na pele..... 29
3.3 Avaliação Histopatológica d efeito fotoprotetor de formulações..... 32
3.4 Formulações fotoprotetoras..... 34
3.5 Filtros solares..... 37
3.6 Adjuvantes da formulação do estudo..... 40
3.6.1 *Formadores de filmes*..... 40
3.6.2 *Emulsionantes*..... 40
3.6.3 *Emolientes*..... 41
3.6.4 *Silicones*..... 41
3.7 Estabilizantes de Emulsões..... 41
3.8 Avaliação de segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras..... 44
3.9 Recomendações do Consenso Brasileiro de Fotoproteção (SBD)..... 46
3.10 Estabilidade de Fotoprotetores..... 46
3.11 Principais componentes dos fotoprotetores deste estudo..... 49
3.11.1 *Dry Flo®*..... 49
3.11.2 *Cocoate BG®*..... 50
3.11.3 *Emulium 22®*..... 51
3.11.4 *Olivem 900®*..... 52
3.12 Análise estatística na otimização de processos e produtos..... 53

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS FOTOPROTETORAS... 56
4.1 Metodologia..... 56
4.1.1 *Matérias-primas*..... 56
4.1.2 *Planejamento fatorial e analise de superfície de respostas*..... 56
4.1.3 *Caracterização Físico-Química das Formulações* 60
4.1.3.1 Análise macroscópica..... 60
4.1.3.2 Tamanho de gotícula..... 60
4.1.3.3 Determinação do pH 60
4.1.3.4 Determinação da Condutividade..... 60
4.1.3.5 Determinação do Fator de Espalhabilidade..... 61
4.1.3.6 Avaliação da Viscosidade Aparente..... 61
4.1.3.7 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)..... 62
4.1.4 *Tratamento Estatístico*..... 63
4.2 Resultados e Discussão..... 63
4.2.1 *Análise macroscópica*..... 63
4.2.2 *Caracterização Físico-Química das Formulações*..... 63
4.2.2.1 Variável Resposta pH..... 65
4.2.2.2 Variável Resposta Condutividade..... 75
4.2.2.3 Variável Resposta FPS..... 84
4.2.2.4 Variável Resposta Tamanho de Gotícula..... 85
4.2.2.5 Variável Resposta Espalhabilidade..... 86
4.2.2.6 Variável Resposta Viscosidade..... 87

5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS..... 94
5.1 Metodologia..... 94
5.1.1 *Estabilidade Preliminar* 94
5.1.1.1 Centrifugação..... 94
5.1.1.2 CicloGelo/Degelo..... 94
5.1. 2 *Estabilidade Acelerada*..... 94
5.2 Resultados e Discussão da Estabilidade Preliminar..... 95

5.2.1 *Centrifugação*..... 95
5.2.2 *Ciclo Gelo/Degelo*..... 95
5.2.3 *Estabilidade Acelerada*..... 97
5.2.3.1 Análise Macroscópica..... 97
5.3.3.2 Tamanho de Gotícula..... 97
5.3.3.3 Determinação do pH..... 97
5.3.3.4 Determinação da condutividade..... 98
5.3.3.5 Avaliação da espalhabilidade..... 98
5.3.3.6 Avaliação da viscosidade..... 98
5.3.3.7 Determinação do fator de proteção solar (FPS)..... 99
5.2.4 *Conclusão da Estabilidade Acelerada*..... 99

6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DA FORMULAÇÃO F1..... 102
6.1 Metodologia..... 102
6.1.1 *Avaliação do efeito fotoprotetor da formulação F1 de aplicação tópica após exposição aguda da pele de camundongos à irradiação UVB*..... 102
6.1.1.1 Animais..... 102
6.1.1.2 Irradiação UVB..... 102
6.1.1.3 Grupos e Tratados..... 103
6.1.1.4 Avaliação da Histologia da Pele..... 104
6.1.1.4.1 Medida da espessura epidermal e quantificação de camadas de células nucleadas da epiderme..... 104
6.1.1.4.2 Contagem de células de queimadura solar..... 105
6.1.1.5 Infiltrados de células inflamatórias..... 106
6.1.1.6 Análise Estatística..... 107
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 107
6.2.1 *Avaliação do efeito fotoprotetor*..... 107
6.2.2 *Quantificação da hiperplasia da epiderme*..... 108
6.2.2.1 Número de camadas de células nucleadas..... 108
6.2.2.2 Espessura da epiderme..... 112

6.2.3 *Número de células de queimadura solar*..... 114
6.2.4 *Análise da epiderme viável*..... 118
6.2.5 *Análise da presença de infiltrados de células inflamatórias nas regiões subepidérmicas*..... 120
7 **CONCLUSÃO**..... 123
REFERÊNCIAS..... 125
ANEXOS..... 133

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os brasileiros estão entre os povos com maior exposição ao sol devido às características geográficas e tendências culturais (SCHALKA et al, 2014). Dentre as radiações que compõem a radiação solar a radiação ultravioleta (UV) é responsável por uma grande variedade de efeitos agudos e crônicos na pele humana. Os efeitos agudos podem ser negativos como fotodano ao DNA celular, eritema, mutação e imunossupressão, ou positivos como a síntese de vitamina D e bronzeamento. As mudanças histopatológicas ocorridas são espessamento da epiderme, infiltração de células inflamatórias, presença de células de queimadura solar, e alteração no conteúdo das fibras colágenas e elásticas. Já os efeitos crônicos descritos são fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese e acredita-se serem induzidos pela mutação e imunossupressão (BRENNER, 2009; MONTAGNER; COSTA, 2009). A gravidade destas complicações depende principalmente da exposição ao sol, fatores genéticos e tipo de pele (RIGO et al, 2015).

Nos últimos anos a expectativa de vida tem aumentado, inclusive nos países em desenvolvimento, estimulando o estudo do processo do envelhecimento. A busca de tratamentos para prevenção, controle e reversão do envelhecimento, particularmente o fotoenvelhecimento, tem despertado muito interesse no meio científico, considerando que a pele expressa de forma visível a ação do tempo e por ele é transformada (MONTAGNER; COSTA, 2009; BAGATIN, 2009). Clinicamente, o fotoenvelhecimento é caracterizado pela perda de elasticidade e hidratação da pele, aumento da rugosidade e formação de rugas mais profundas, bem como pigmentação irregular (KLIGMAN; KLIGMAN , 1986).

O câncer é uma doença que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células em diversos tecidos e órgãos. No Brasil a estimativa 2016-2017 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente na população (180 mil casos novos), correspondendo a 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O método mais efetivo de prevenir o fotoenvelhecimento e suas malignidades é evitar a exposição direta aos raios ultravioleta, fazendo uso de fotoprotetores. Porém um estudo utilizando dados coletados na Campanha Nacional de Prevenção ao Câncer de Pele da Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) revelou que os brasileiros não se protegem

adequadamente do sol, elevando a incidência da doença. Segundo este mesmo estudo, 70% dos brasileiros não utilizam fotoprotetores (SBD, 2015).

De acordo com Omar Lupi, presidente da SBD "O uso do filtro solar é uma questão de saúde pública. Todo brasileiro deve se conscientizar que o filtro não é um tratamento estético ou mais uma ferramenta no combate ao envelhecimento. É, sim, uma arma poderosa contra o câncer da pele, que faz milhares de vítimas no país a cada ano".

Frente a esta realidade, um grande desafio para os formuladores está no desenvolvimento de formulações que além de garantir a estabilidade termodinâmica, eficácia e segurança, precisam ter boa aceitação do consumidor. As emulsões são ótimos veículos para filtros solares devido à sua versatilidade, proporcionam uma excelente película protetora sobre a pele, tem excelente apresentação e são de custo relativamente baixo. Fotoprotetores são substâncias de aplicação cutânea, existindo no mercado em diferentes apresentações e contendo em sua formulação ingredientes capazes de interferir na radiação solar que atinge a pele, reduzindo seus efeitos deletérios (OSTERWALDER , LIM, 2007).

Um tipo específico de emulsão é o creme gel, muito utilizado no Brasil devido ao clima tropical, pois nele são adicionados polímeros que reduzem a necessidade de ceras na formulação total, mantendo a viscosidade e a estabilidade do produto. Desse modo tem-se uma formulação de toque final suave, de melhor espalhabilidade e maior aceitação pelo público. Tais evidências nos permitiram desenvolver formulações utilizando esse tipo de veículo e estudá-las em detalhes conforme descrições adiante.

Conhecendo as exigências do consumidor da farmácia magistral e seguindo uma tendência de apelo ao natural os componentes definidos nesse trabalho, como variáveis do planejamento fatorial, os quais são ativos modificados tecnologicamente de fontes como óleos de coco, oliva e castanha do Pará, atribuem emoliência e consistência à formulação, acentuando o toque seco, característico das emulsões creme gel.

Por conseguinte, torna-se necessário o desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões fotoprotetoras, bem como o efeito fotoprotetor *in vivo* de modo a obter-se uma formulação com fator de média proteção solar, adequada estabilidade com segurança e eficácia.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A escolha do tema teve como motivação o desenvolvimento de um fotoprotetor para fins de registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e comercialização por uma farmácia magistral localizada em João Pessoa, cujas características fossem FPS (fator de proteção solar) de média proteção (15 – 30), de amplo espectro (UVA e UVB), seguro, toque seco, uso facial, boa aceitação pelo cliente e comprovação científica do ponto de vista de caracterização físico-química e boa estabilidade termodinâmica. A escolha pelo FPS de média proteção foi baseada na preferência do consumidor.

Foram então desenvolvidas formulações que tiveram como referencial uma formulação já consagrada na citada farmácia, de grande aceitação pelo cliente e líder de vendas com características sensoriais de toque seco, sem residual branco, boa espalhabilidade. Porém esta formulação carecia de estudos científicos, sendo baseada na experiência técnica e literatura em geral. Buscou-se então o embasamento científico que comprovasse a eficácia e segurança do produto final com resultados concretos que pudessem ser apresentados aos médicos prescritores.

Assim sendo, esse fato ocasionou a parceria da citada farmácia com pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento de Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB (PPGCF), entendendo ser parte do portfólio de pesquisas do mesmo, desse modo incentivando a parceria da iniciativa privada com a academia no sentido da geração de produtos.

2.2 Objetivo Geral

Desenvolver formulação fotoprotetora eficaz e segura utilizando a ferramenta de planejamento fatorial e análise de superfície de respostas, com a finalidade de registrar um produto junto a Anvisa, com posterior comercialização por uma farmácia magistral na cidade de João Pessoa.

2.3 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência das variáveis independentes (tipo de cera, emoliente e agente modificador de sensorial) na otimização de emulsões fotoprotetoras através do planejamento fatorial 2^3;
- Caracterizar as formulações segundo parâmetros organolépticos (cor, odor), físico-químicos (tamanho de gotícula, pH, condutividade), reológicas (viscosidade) e fator de proteção solar (FPS);
- Estudar a estabilidade das formulações através de estudo prévio e de estabilidade acelerada;
- Avaliar os efeitos fotoprotetores da formulação escolhida sobre os danos na pele causados pela radiação UVB e compará-la com filtro comercial, em camundongos, através dos seguintes parâmetros: medida de espessura da epiderme, número de camadas de células nucleadas da epiderme, número de células de queimadura solar e presença de infiltrados inflamatórios na região subepidérmica.

.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

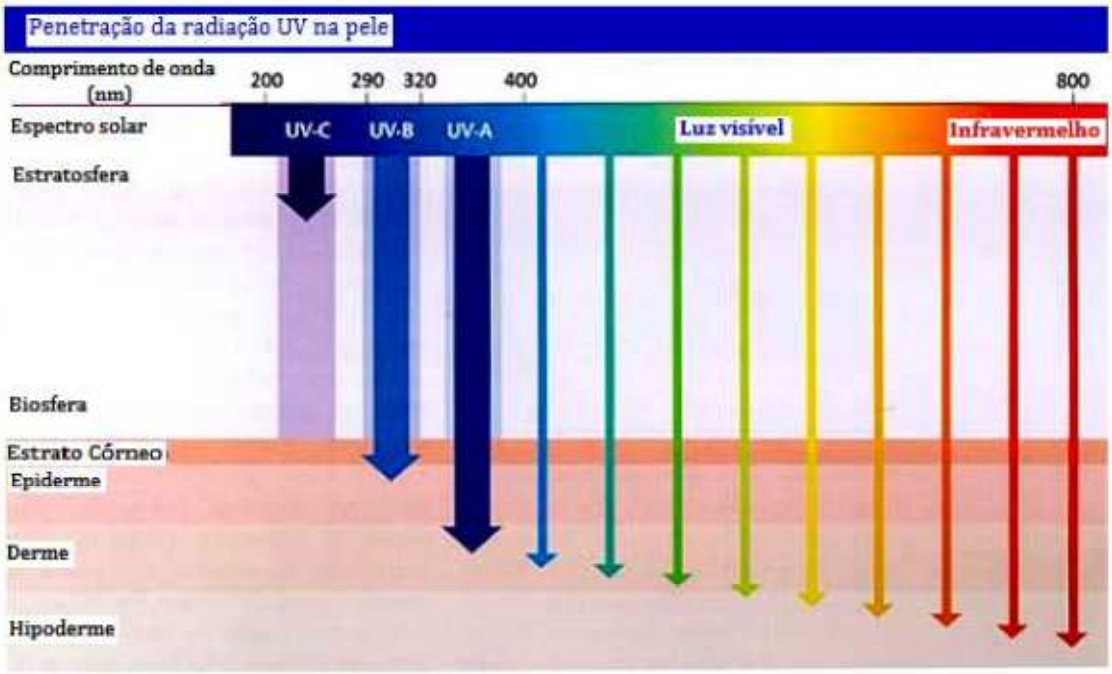
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Radiação Ultravioleta (UV)

O Brasil recebe uma grande incidência de sol, pois está localizado em grande parte entre o trópico de capricórnio e a linha do equador, sendo que nessa área existe um aumento do número de pessoas com câncer de pele (CABRAL, PEREIRA, PARTATA, 2013). A camada de ozônio que envolve o planeta é uma grande absorvedora da radiação ultravioleta (UV), predominantemente se concentrando em regiões mais altas da atmosfera, exatamente a região onde se encontra grande parte do território brasileiro (SCHALKA et al, 2014).

O espectro solar que atinge a superfície terrestre é formado predominantemente por radiação UV (100-400nm), radiação visível (400-750nm) e infravermelha (acima de 750nm) como demonstrado na Figura 1. A radiação ultravioleta (UV) é classificada em UVA (comprimento de onda de 320 a 400 nm), UVB (comprimento de onda de 290 a 320 nm) e UVC (comprimento de onda de 270 a 290nm). A radiação UVA se subdivide em UVA I (340 a 400 nm) e UVA II (320 a 340 nm). A exposição à radiação UVA, ondas mais longas, penetram de modo mais profundo, atingindo fibroblastos da derme e estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ocasionando lesão indireta no DNA, enquanto que a radiação UVB, de ondas curtas, é mais absorvida na epiderme e afeta predominantemente os queratinócitos, sendo responsável por provocar lesão direta nas proteínas e no DNA por meio da produção de dímeros ciclobutano-pirimidínicos. A exposição à radiação UVB por tempo prolongado pode ocasionar queimaduras, imunossupressão e carcinogênese. O fotodano ao DNA pode resultar em mutações no gene que parece ser o primeiro passo para indução de câncer de pele não melanoma (CARINI M. et al, 2000; KRUTMANN, 2001; BECKLUND B.R. et al, 2010;COSTA, 2012). O aumento da incidência de tumores de pele após a exposição UV deriva das influências combinadas de danos ao DNA e efeitos na epigenética que incluem mudanças na sinalização e na expressão do gene, mudanças essas que regulam em curto prazo a proliferação e a sobrevivência celular, enquanto a longo prazo contribuem para o desenvolvimento do câncer de pele (EL-ABASERI; PUTTA;HANSEN, 2006).

Figura 1 – Penetração do espectro solar na pele.

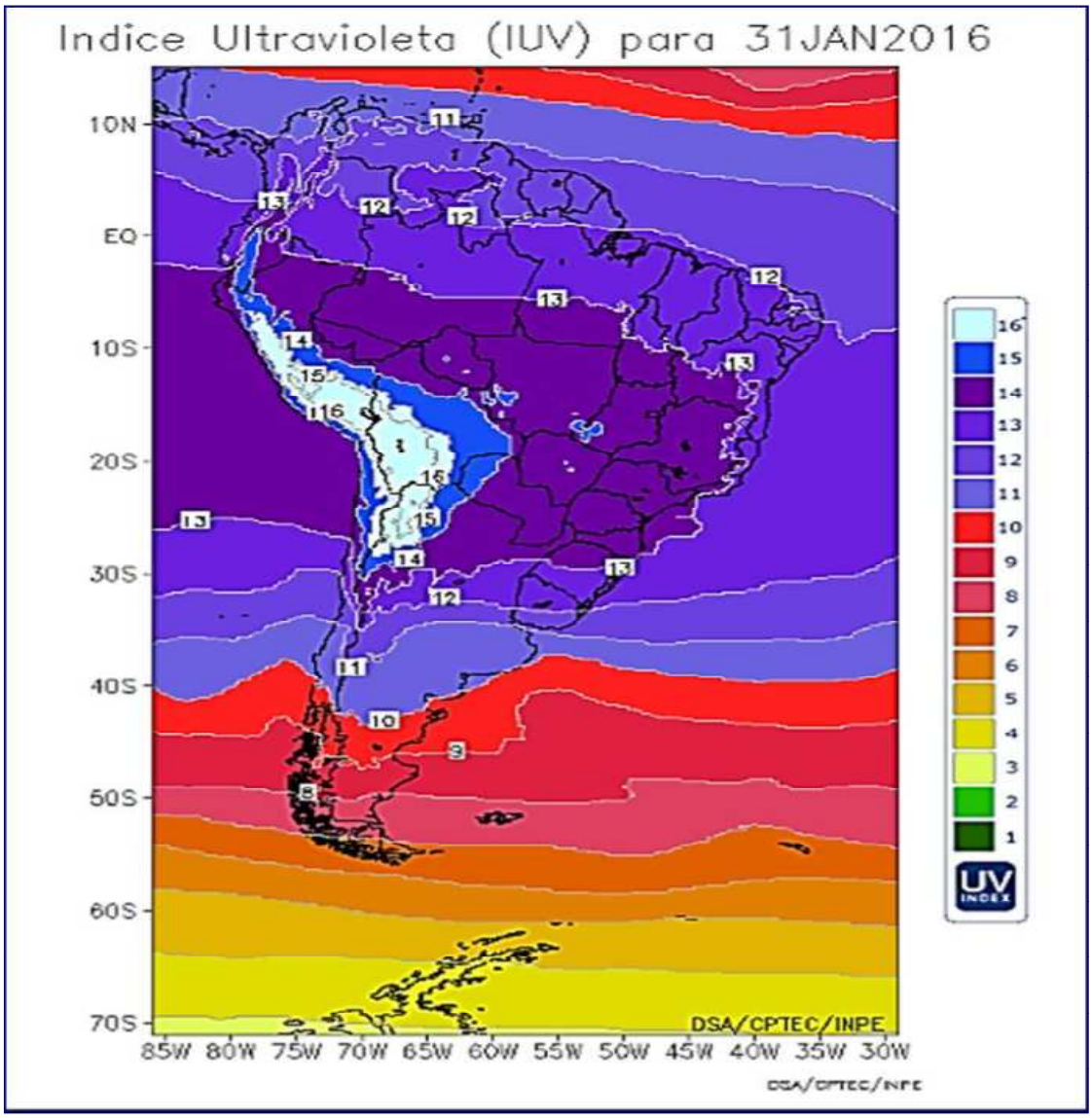


Fonte: TEIXEIRA, 2010.

O índice de ultravioleta (IUV) é uma escala de valores recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É uma medida da intensidade da radiação UV incidente sobre a superfície terrestre, relevante aos efeitos sobre a pele humana. Tem por objetivo simplificar a informação sobre os níveis de radiação UV ao público, numa escala de 0 a 16, podendo ocorrer limites maiores, sendo que quanto maior o valor, maiores os danos para a pele e olhos. Para o cálculo do IUV é considerado o teor de ozônio, a atmosfera e a posição geográfica. O IUV pode variar em função da hora do dia, da estação do ano, da altitude e das condições atmosféricas (SCHALKA et al, 2014).

No site do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) estão disponíveis informações da distribuição do IUV em tempo real no planeta (Figura 2), onde se observa que a região nordeste do país apresenta um índice entre 8 e 9, o que é considerado muito alto, podendo chegar a 12 e 13 no verão, fato que reforça a importância das pesquisas em fotoprotetores a fim de disponibilizar à população um produto seguro e eficaz (INPE, 2016).

Figura 2 – Índice de Radiação Ultravioleta Máxima na América do Sul.



CATEGORIA	ÍNDICE ULTRAVIOLETA
BAIXO	< 2
MODERADO	3 a 5
ALTO	6 a 7
MUITO ALTO	8 a 10
EXTREMO	> 11

Fonte:INPE, 2016.

No Brasil, através do Consenso Brasileiro de Fotoproteção, criado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), algumas recomendações são dadas seguindo o conceito mundial de fotoeducação, onde podem ser destacadas (SCHALKA et al, 2014): 1) Indíviduos

com calvície parcial ou total devem usar chapéus e fotoprotetores no couro cabeludo; 2) A fotoproteção das orelhas deve ser feita com regularidade; 3) Para proteger a região periórbita devem ser utilizados óculos de sol com lentes de proteção UV; 4) A região labial deve ser protegida com formulações contendo fator de proteção solar e adequadas a esse tipo de pele.

O termo "fotoeducação" foi criado em 1988 para determinar quem, onde e qual a importância da proteção à radiação UV, sendo depois expandido, mostrando também os efeitos positivos da exposição ao sol (STENGEL, FERNANDEZ apud SCHALKA et al, 2014).

3.2 Principais efeitos da radiação solar na pele

Nos últimos 40 anos, ocorreram muitos avanços na compreensão dos mecanismos do envelhecimento, o qual é considerado um processo biológico complexo, contínuo, que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose), além de ser considerado de grau variável de um indivíduo para outro e de órgão para órgão (BAGATIN,2009).

Ainda segundo Bagatin (2009), divide-se o envelhecimento cutâneo em intrínseco ou cronológico e extrínseco ou fotoenvelhecimento, sendo esse último relacionado diretamente à exposição solar crônica e descontrolada. Porém, atualmente sabe-se que os mecanismos celulares e moleculares são os mesmos, ou seja, o fotoenvelhecimento nada mais é que a superposição dos efeitos biológicos da radiação ultravioleta A e B sobre o envelhecimento intrínseco. O fotoenvelhecimento e o envelhecimento intrínseco apresentam diferentes alterações morfológicas as quais podem ser comparadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Alterações cutâneas provocadas por envelhecimento intrínseco e extrínseco

	Envelhecimento Intrínseco (Cronoenvelhecimento)	Envelhecimento Extrínseco (Fotoenvelhecimento)
Rugas	Finas	Profundas
Camada Córnea	Inalteradas	Afiladas
Células Displásicas	Poucas	Muitas
Fibras de Colágeno	Pequena alteração no tamanho e organização	Grande alteração no tamanho e organização
Fibras Elásticas	Reorganizadas	Diminuição na produção e aumento da degeneração
Foliculo Capilar	Menor número e afinamento	Diminuição no número e estrutura:perda capilar
Melanócitos	Normal	Diminuição do número e da melanina
Glândulas Sebáceas e Sudoríparas	Menor número	Diminuição do número: pele seca
Junção Dermoepidémica	Leve achatamento	Importante achatamento
Microvasculatura	Área reduzida	Telangiectasias, equimoses, infiltrado inflamatório perivascular
Alterações Benignas	Ceratose seborreica	Ceratose seborreica
Alterações Pré-Malignas	-	Ceratose actínica
Alterações Malignas	-	Carcinoma espinocelular

Fonte: MONTAGNER; COSTA (2009).

Tanto o processo de envelhecimento intrínseco, quanto o extrínseco apresentam efeitos quali e quantitativos sobre colágeno e fibras elásticas da pele (EL-DOMYATI et al., 2002), no entanto, com relação ao colágeno, ocorre de forma significativamente diferente.No envelhecimento intrínseco a síntese de colágeno é diminuída, enquanto que no extrínseco, ocorre uma maior degradação do mesmo. Essas diferenças se traduzem em diferentes aspectos entre a pele naturalmente envelhecida e com fotodano (CHUNG et al., 2001). A formação do colágeno severamente modificado leva ao enrugamento da pele e à elasticidade diminuída; a essa degeneração das fibras elásticas e colágenas da pele dá-se o nome de elastose solar (CASAGRANDE R. et al, 2006; SIMIS, T., SIMIS, D.R.C., 2006).

A pele humana é composta pela epiderme celular estratificada queratinizada, que além dos queratinócitos (correspondem a 90% das células), possui os melanócitos (responsáveis pela pigmentação cutânea); possui ainda, células de Merkel (associada a receptores sensitivos) e células de Langerhans (responsáveis pelo reconhecimento de antígenos externos); a derme subjacente, resistente camada de tecido conjuntivo, é rica em fibras colágenas e elásticas, além de fibroblastos e outras células conjuntivas, e a hipoderme

ou tecido subcutâneo, uma camada de tecido adiposo que protege contra choques e funciona como isolante térmico (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1994). A espessura da epiderme varia de acordo com o número de camadas de células, a idade do indivíduo e do local revestido por ela, sendo mais espessa nas regiões palmares e plantares (1,0 a 1,5mm) e mais fina nas pálpebras (0,4 a 0,8mm). O colágeno corresponde a 70-80% do peso da pele seca e confere à derme integridade mecânica e estrutural; já a elastina é um componente menor da derme, porém tem uma função importante no fornecimento da elasticidade da mesma (UITTO, 1979).

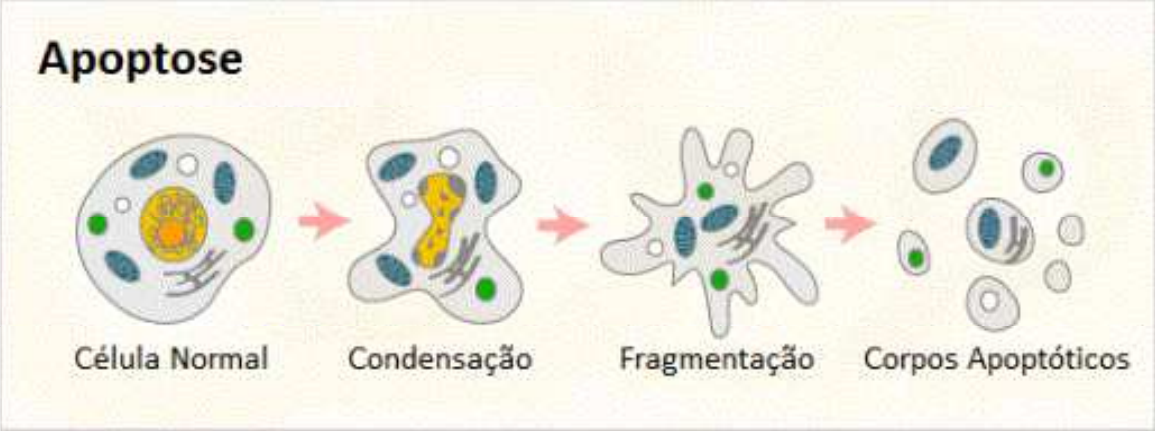
Queimadura solar consiste em sua forma mais suave em um vermelhidão ou eritema da pele exposta, de acordo com a intensidade, com o tempo de exposição à radiação solar, a susceptibilidade genética e a pigmentação da pele. O organismo humano pode manifestar alterações fisiológicas importantes como desenvolver um processo inflamatório com a produção de mediadores pró- inflamatórios como as citocinas e prostaglandinas em sua maioria produzidas pelos queratinócitos, e infiltração de neutrófilos no local irradiado acompanhado de dor, edema e calor. Os queratinócitos podem sofrer apoptose, chamadas de células de queimadura solar (CQS), como um mecanismo de defesa contra os efeitos da radiação UV decorrentes de danos no DNA e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS); este processo pode atingir células da camada basal na epiderme (LAETHEM *et al.*, 2005; CASAGRANDE R. *et al*, 2006; RYSER *et al.*, 2014).

A apoptose é um programa de morte celular programada de grande eficiência que leva a alterações morfológicas bem definidas, consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. A apoptose é um fenômeno rápido onde ocorre retração da célula (encolhimento do citoplasma), levando à perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, a cromatina sofre condensação chamada de núcleo picnótico, esta morfologia é característica da célula picnótica. Em seguida, a membrana celular forma prolongamentos e ocorre fragmentação do núcleo bem como do DNA. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular, estas porções celulares são denominadas de corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos (Figura 3). A apoptose ocorre em uma série de eventos fisiológicos normais como na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, bem como na resposta inflamatória, na eliminação de células após dano celular por agentes tóxicos, microrganismos ou radiação ionizante, que é o caso da radiação UV (GRIVICICH I. *et al.*, 2007). Alterações nos genes

responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico podem ocasionar diversas patologias como doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), osteoporose, lesões secundárias pós isquemia, câncer, entre outras. Qualquer distúrbio na regulação do processo da apoptose, tanto o excesso quanto à deficiência, podem provocar várias doenças (ANAZETTI M. C., MELO P.S., 2007).

O desenvolvimento do câncer ocorre quando há uma falha no controle do processo de renovação celular, ou seja, na proliferação e morte celular. Em organismos saudáveis as células morrem via apoptose, no entanto a inibição da proliferação celular é característico na maioria das células cancerosas que requerem que a apoptose seja suprimida e as células danificadas continuem a proliferar. A maioria das abordagens no tratamento do câncer como quimioterapia e radioterapia, matam as células cancerosas por indução da apoptose, no entanto, estas células desenvolvem frequentemente resistência a este tipo de terapia (HUNTER A.M. *et al*,2007)

Figura 3 –Efeitos Celulares da Apoptose



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

3.3 Avaliação histopatológica do efeito fotoprotetor de formulações

A avaliação histopatológica do tecido cutâneo é de grande importância nos estudos do comportamento de substâncias ativas, podendo nortear a indicação de uso das formulações, identificar efeitos adversos e auxiliar nos estudos de eficácia. Os estudos histopatológicos e histométricos podem contribuir na avaliação dos danos causados pela radiação UV na pele e se houve proteção contra estes danos ao se aplicar substâncias ativas, pois permitem a

avaliação do tecido epitelial, da derme e das estruturas celulares (MAIA CAMPOS et al.,2006). Estas técnicas têm sido consideradas adequadas para avaliar os efeitos fotoprotetores *in vivo*.

A análise histopatológica consiste na observação visual de biópsias utilizando o microscópio ótico, avaliando qualitativamente as estruturas presentes no tecido cutâneo. Utilizando a coloração de hematoxilina e eosina, pode-se verificar a hiperplasia epidérmica, presença de células de queimadura solar e presença de infiltrados inflamatórios após a exposição à radiação UV. A histometria permite quantificar os efeitos observados na análise qualitativa tais como número de células de queimadura solar, espessura da epiderme e número de camadas de células nucleadas, aplicando testes estatísticos para avaliar se as diferenças ocorridas são estatisticamente significativas em relação ao controle (DAL'BELO, 2008). Ainda segundo o mesmo autor, a contagem de células de queimadura solar também é um marcador muito utilizado para avaliação da atividade fotoprotetora de diferentes substâncias ativas. Muitos estudos mostram que a utilização de fotoprotetores reduzem a formação de células de queimadura solar mas a relação entre FPS e a prevenção de CQS ainda não foi adequadamente determinada (SHEEHAN J. M, YOUNG A. R., 2002).

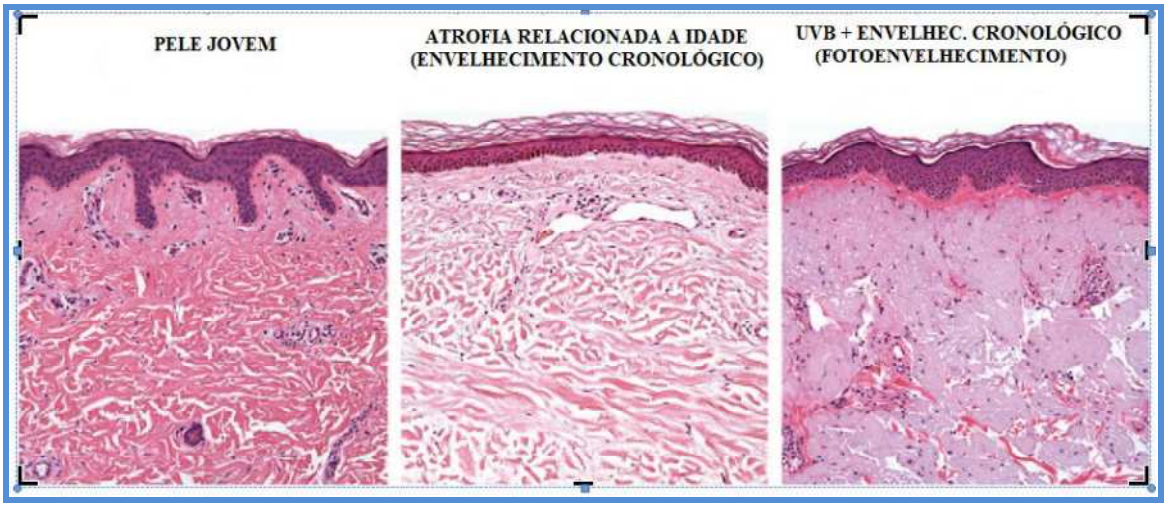
Estudos têm avaliado substâncias ativas fotoprotetoras através da quantificação da hiperplasia epidérmica induzida pela radiação UV por meio da medida da espessura epidermal e da contagem de camadas de células nucleadas da epiderme (LU et al., 1999; EL-ABASERI; PUTTA;HANSEN, 2006).

Uma característica histológica chave na pele fotoenvelhecida é a presença de fotodano crônico, caracterizado pela deposição anormal de fibras elásticas e colágenas na derme superficial, a chamada elastose: um indicador histológico de comprometimento cutâneo pela radiação solar (LAGA A.C., MURPHY G.F., 2009). A Figura 4 apresenta uma comparação entre a pele jovem, a pele cronoenvelhecida e a fotodanificada. A pele cronoenvelhecida apresenta atrofia dérmica e epidérmica sem elastose significativa, já na pele fotoenvelhecida observa-se depósitos amorfos e aglutinados das fibras elásticas (elastose acentuada), presença de células de queimadura solar (células apoptóticas) e aumento das células inflamatórias na região subepidérmica (OUHTIT A., *ET AL*, 2000; LAGA A.C., MURPHY G.F., 2009).

Para avaliação dos efeitos de diversas substâncias naturais ou sintéticas com finalidade fotoprotetora, vários estudos têm utilizado modelo animal, sendo que o camundongo sem pelo

ou depilados tem sido um modelo útil uma vez que mimetiza os efeitos da radiação UV na pele humana (LU et al., 1999).

Figura 4 – Comparação histológica entre a pele jovem, cronoenvelhecida e fotoenvelhecida



Fonte: LAGA, A.C., MURPHY, G.F. (2009).

3.4 Formulações Fotoprotetoras

Com a crescente conscientização ao longo dos últimos anos dos efeitos prejudiciais da radiação solar UV, os fotoprotetores estão se tornando parte da vida cotidiana em várias apresentações quer seja sob a forma de hidratantes diários, produtos antienvelhecimento, e mesmo cosméticos, que vão além dos tradicionais produtos de praia ou atividades recreativas/esportivas.

Ao desenvolver uma formulação fotoprotetora, além dos requisitos universais como segurança, com adequada preservação microbiana, eficaz, estável nas condições típicas de armazenamento, deve-se ter em mente qual o intuito do produto final: se irá ser utilizado na praia, em qual local do corpo será aplicado, se fará parte de um hidratante ou de um cosmético antienvelhecimento, bem como o veículo a ser empregado, loção, creme, stick, gel ou spray. Qual a proteção desejada e o espectro de ação são outros requisitos importantes no desenvolvimento da formulação bem como a sensação desejada no momento da aplicação do produto na pele. Conhecer a regulamentação do assunto no país que se pretende comercializar é extremamente importante, pois as mesmas variam consideravelmente em todo o mundo (TANNER, 2006).

De acordo com a Anvisa, protetor solar é "[...] qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação." (BRASIL, 2012). O fotoprotetor deve ser aplicado uniformemente sobre a superfície da pele e a penetração dos ingredientes deve ser minimizada para que o produto aja interceptando a radiação UV antes que a mesma cause danos a componentes viáveis da pele.

As concentrações de filtros solares podem corresponder de 5 a 35% do total da formulação, sendo o ponto central de um sistema ativo fotoprotetor (TANNER, 2006). Os filtros solares (ativos) são utilizados em associação com vários objetivos, entre eles a obtenção de um alto FPS e amplo espectro de proteção no produto final, estabilidade, diminuição de custos e menor poder alergênico/irritante. Para se obter um FPS alto pode-se aumentar a concentração de filtros solares na formulação, porém pode ocorrer também um aumento do potencial alergênico. Além disso, a partir de certa concentração ocorre uma saturação, não havendo mais aumento do FPS; inclusive, a legislação limita a concentração por essas razões (WUNCH, 2001).

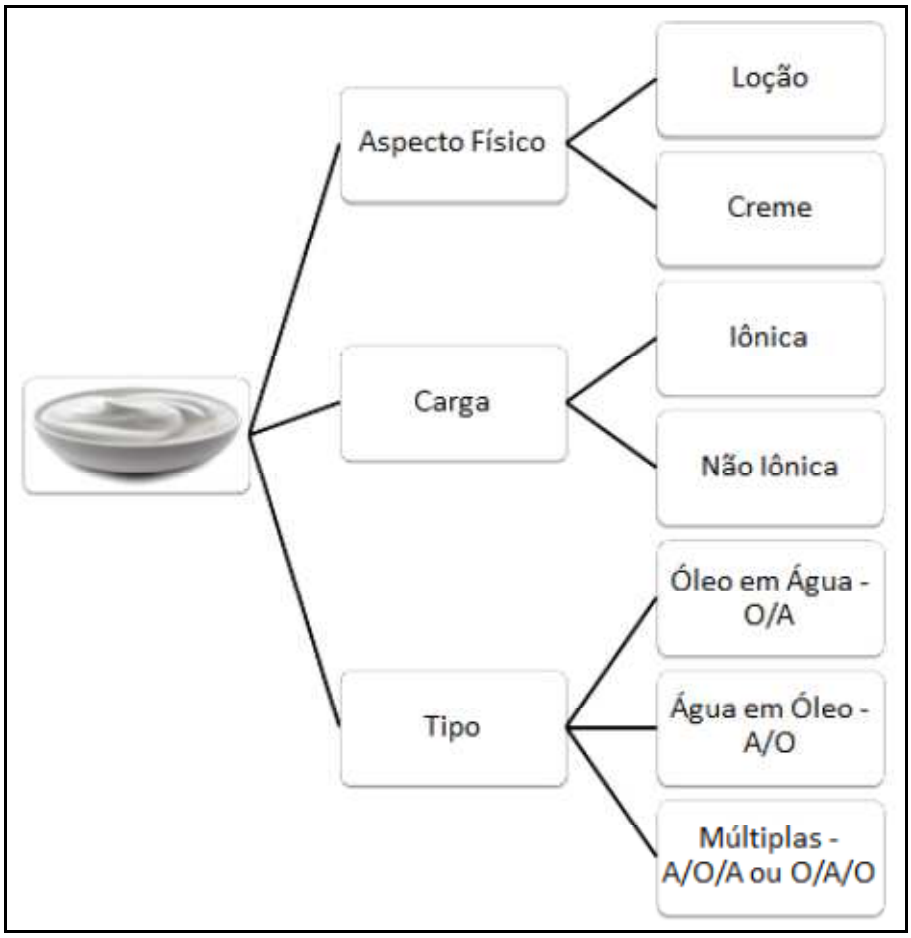
Além dos ativos, as formulações fotoprotetoras possuem outros componentes como veículo, emolientes, emulsificantes, hidratantes, modificadores de sensorial, estabilizantes, conservantes, essências, entre outros. Alguns componentes podem ser adicionados à formulação para melhorar a espalhabilidade e aumentar a resistência à água e suor. Para aumenta-los devem ser adicionados componentes hidrofóbicos com ação filmógena, fixando os fotoprotetores na pele e impedindo sua retirada no contato com a água. Alguns exemplos de formadores de filme são os copolímeros de polivinilpirrolidona (PVP) eicosano, hexadeceno e tricotanil (RIBEIRO, 2010).

O veículo a ser utilizado na formulação constitui um aspecto importante e seu modo de preparação pode afetar a eficácia da formulação (SCHALKA et al, 2014

As emulsões certamente constituem os veículos mais utilizados nas formulações fotoprotetoras; são compostos de uma fase oleosa e outra aquosa, não miscíveis, necessitando de um agente emulsionante (tensoativo) para que se torne uma mistura homogênea. São veículos versáteis, de toque agradável e compatíveis com a incorporação, tanto de ativos lipossolúveis quanto hidrossolúveis, sendo por isso os mais utilizadas (RIBEIRO, 2010). Além disso, é relativamente fácil controlar o comportamento reológico e a formação do filme

sobre a pele (TANNER, 2006). As emulsões constituem um capítulo à parte, podendo ser classificadas segundo a Figura 5 (PRISTA et al, 1995;FERREIRA. 2008).

Figura 5 – Classificação das emulsões



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

- Emulsões água em óleo (A/O) – incorporam apenas ativos lipofílicos; sua fase interna é aquosa e a externa é oleosa, o que faz com que o produto permaneça mais tempo no local de aplicação.
- Emulsões óleo em água (O/A) - incorporam ativos hidrofílicos; a fase interna é oleosa ou lipofílica e a externa é aquosa ou hidrofílica, promovendo uma sensação de frescor e apresentando absorção rápida.

Para saber se a emulsão é O/A ou A/O pode-se acrescentar água e corante hidrossolúvel; se homogeneizar a coloração a preparação é do tipo O/A, senão, a emulsão é do

tipo A/O (AULTON, 2005). Em fotoprotetores a base de emulsões do tipo O/A é mais usada (TANNER, 2006).

Uma emulsão é de boa qualidade quando apresenta pequenas gotículas (entre 0,1 e 10 μm) e pode formar filmes interfaciais estáveis o suficiente para manter o equilíbrio entre as fases. O tamanho das gotículas dispersas é influenciado por fatores mecânicos (método e equipamento utilizado para a mistura) e pelos agentes emulsificantes (FERREIRA, 2008).

O creme gel resulta da incorporação de um agente gelificante numa emulsão. São muito utilizados em formulações fotoprotetoras, especialmente em países tropicais, para conferir o efeito sensorial de géis e a suavidade de emulsões, sem as suas desvantagens (viscosidade e oleosidade, respectivamente). São indicados para uso diário em pessoas com pele oleosa (REBELLO, 2008).

3.5 Filtros solares

Fotoprotetores são definidos como formulações de aplicação cutânea em diferentes apresentações que contêm componentes capazes de interferir na radiação solar (filtros solares), reduzindo seus efeitos deletérios (OSTERWALDER, LIM, 2007). São encontrados com o sinônimo de protetores solares ou filtros solares, porém este último termo se adequa mais à substância química (ativo) com essa ação.

Os filtros solares podem ser classificados em químicos (orgânicos) ou físicos (inorgânicos). Os inorgânicos refletem ou difratam a radiação e os orgânicos possuem um mecanismo de rearranjo das duplas ligações de grupos cromóforos, onde os elétrons de orbitais de menor energia absorvem radiação e são excitados para orbitais de maior energia, tanto em cadeia cíclica (anel benzênico), quanto linear. Quando esses elétrons retornam ao seu estado de repouso, liberam a energia na forma de luz fluorescente, fosforescente ou calor, radiações menos energéticas inofensivas ao ser humano. (SCHALKA, REIS, 2011). Os filtros orgânicos são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos e, geralmente, possuem um grupo doador de elétrons como, por exemplo, uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático; são subdivididos em derivados para-aminobenzóicos, cinamatos, salicilatos, benzimidazóis, derivados do benzilideno cânfora e benzofenonas; os principais representantes dos inorgânicos são dióxido de titânio e óxido de zinco (RANGEL, CORRÊA, 2002; CABRAL, PEREIRA, PARTATA, 2011). Neste estudo foram utilizados seis filtros solares orgânicos: derivado triazina (bemotrizinol), derivado dos cinamatos (metoxicinamato de octila), derivados de benzofenona (benzofenona 3), derivado de salicilato

(salicilato de octila), derivado de dibenzoilmetano (avobenzona), derivado da cânfora (metilbenzilideno cânfora).

No aspecto regulatório existem duas normas que regulamentam atualmente os fotoprotetores: a RDC 47, de 2006, que aprova a lista de fotoprotetores ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes (BRASIL, 2006) e a RDC 30, de 1º de junho de 2012, com as normas do Mercosul sobre protetores solares em cosméticos, dando outras providências (BRASIL, 2012). Esta última foi criada para padronizar definições, requisitos técnicos, critérios de rotulagem e métodos de avaliação de eficácia relacionados a fotoprotetores solares e produtos multifuncionais entre os países que compõem o Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Venezuela).

De acordo com exigência do FDA (*Food and Drug Administration Agency* – órgão regulatório americano) para protetores solares publicada nos EUA, em 14 de junho de 2011, os fabricantes não podem usar a declaração "bloqueador solar", por exagerar sua eficácia uma vez que filtros UV não proporcionam uma proteção de 100% para a pele (FREITAS, 2015). No Brasil, segundo a RDC 30/2012, os protetores solares não devem possuir alegações de rotulagem que confiram 100% de proteção contra a radiação UV ou efeito antissolar, nem denominações que induzam a uma proteção total ou bloqueio da radiação solar.

Os fotoprotetores são classificados pela Anvisa como cosméticos grau 2, dispensando a necessidade de prescrição médica para serem vendidos.

A RDC 47, de 2006, relaciona os ativos com ação de filtros solares permitidos, sua concentração máxima (%) e que podem ser utilizados em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Desses ativos os mais comumente utilizados estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de filtros solares permitidos no Brasil e seus espectros de proteção

Filtro Solar	Concentração máxima autorizada	Espectro de Proteção
Antranilato de mentila	5%	UVA curto (+), UVA longo (+)
Benzofenona 2	10%	UVA curto (+), UVA longo (++), UVB (+)
Benzofenona 3	10%	UVA curto (++), UVA longo (+),UVB (++)
Benzofenona 4	10%	UVA curto (+), UVA longo (+),UVB (+)
Butil metoxi dibenzoilmetano(Avobenzona)	5%	UVA curto (++), UVA longo (5+),UVB (+)
Dietilamino hidroxibenzoil hexibenzoato	10%	UVA curto (2+), UVA longo (3+)
Fenil dibenzimidazol tetrasulfonato de sódio	8%	UVA curto (4+), UVA longo (+),UVB (2+)
Homosalato	15%	UVA curto (+)
Metilbenzidileno cânfora	4%	UVA curto (+), UVB (4+)
Octil dimetil PABA	8%	UVA curto (+), UVB (3+)
Octil triazona	5%	UVB (6+)
Octocrileno	10%	UVA curto (+), UVB (+)
Óxido de zinco	25%	UVA curto (2+), UVA longo (4+),UVB (2+)
Metoxicinamato de octila	10%	UVA curto (+), UVB (4+)
Bemotrizinol	10%	UVA curto (++),UVA longo (4+),UVB (4+)
Salicilato de octila	5%	UVB (+)

Cruz (+) - intensidade de proteção/UVA curto - 320 a 340 nm/UVA longo – 340 a 400 nm
FONTE: RIBEIRO, 2010.

Segundo Ribeiro (2010), para uma proteção efetiva, abrangendo os raios UVA e UVB, é necessário utilizar dois ou mais ativos. Nas formulações deste estudo, foram utilizados seis filtros solares com espectro de absorção no ultravioleta A e B, descritos a seguir.

O bemotrizinol é um filtro solar de amplo espectro UVA/UVB com absorção máxima nos comprimentos de onda de 310 e 343nm, e com coeficientes de extinção molar de 46.800 $mol^{-1}cm^{-1}$ e 51.800 $mol^{-1}cm^{-1}$. Possui efeito sinérgico com outros filtros UVB, estabilizando-os e propiciando a obtenção de filtros com alto FPS. O coeficiente de extinção molar está relacionado à capacidade absorvedora de radiação do filtro. Quanto maior o valor deste coeficiente, mais eficaz é o filtro como absorvedor de UV (RIBEIRO, 2010; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015).

Dentre os cinamatos, o metoxicinamato de octila é o filtro solar mais utilizado em formulações fotoprotetoras por possuir amplo espectro UVB. Possuem relativa fotoinstabilidade, sendo então associados a filtros com espectro mais amplo para contornar o problema (RIBEIRO, 2010).

Os salicilatos são bastante estáveis e são ideais para proteção UVB, seguros e de fácil manipulação; os derivados da benzofenona e dibenzoilmetano (avobenzona) são amplamente utilizados com a finalidade de proteção na faixa UVA. Os derivados do benzilideno cânfora são fotoprotetores UVB, permitindo um FPS elevado em baixas concentrações, o que é uma grande vantagem, além de apresentar fotoestabilidade (Tabela 1) (CABRAL, PEREIRA, PARTATA, 2011).

3.6 Adjuvantes da formulação do estudo

As formulações fotoprotetoras contêm grande parte de água que evapora quando o produto é aplicado na pele, deixando uma camada fina de componentes não voláteis, que são os filtros solares, emolientes e outros produtos - muitas vezes, de caráter oleoso - que podem conferir efeito gorduroso ou pegajoso, aspecto considerado inconveniente pelo consumidor. Um grande desafio aos formuladores é conciliar aspecto, proteção solar efetiva, compatibilidade com a pele e custo, considerando que filtros solares estão entre os componentes de maior custo da formulação (TANNER, 2006).

3.6.1 Formadores de filmes

O agente filmógeno escolhido para a formulação deste estudo foi o Antaron V216 (copolimero de vinilpirrolidona), que apresenta uma excelente barreira de resistência à água, o que contribui para a fixação dos filtros por mais tempo na pele. Alguns silicones podem aumentar a resistência das formulações à água; o elastômero de silicone (Silicone DC 9040), escolhido para este estudo, é uma mistura de elastômero de silicones de alto peso molecular em ciclometicone que, dependendo das concentrações usadas, contribuem para este efeito, bem como emulsionantes poliméricos tipo Pemulen® (RIBEIRO,2010).

3.6.2 Emulsionantes

Os emulsionantes utilizados no estudo foram Olivem 900® , Emulium 22®, Ceteareth-20® e Pemulen TR2®. O Olivem 900® é um sistema emulsificante não-iônico para emulsões O/A

e atua como modificador reológico de emulsões de modo eficaz, doando à emulsão algumas propriedades peculiares como toque muito leve e sedoso, mesmo que a quantidade de óleo e substâncias graxas em geral sejam altas (OLIVEM 900®, 2015). A partir de emulsionantes não iônicos Emulium 22® e Ceteareth-20®, obtêm-se emulsões do tipo O/A. O Pemulen TR2®, emulsionante polimérico, possui a vantagem de conferir sensorial agradável ao produto final e alta estabilidade, além de contribuir com o aumento da resistência à água (RIBEIRO,2010).

3.6.3 Emolientes

O emoliente, ou a mistura destes, possui um papel importante quando se trabalha com fotoprotetores orgânicos. Pode aumentar a solubilização de filtros orgânicos sólidos, reduzindo as chances de recristalização do filtro e, consequentemente, aumentando a estabilidade da formulação final, mantendo a eficácia do produto (RIBEIRO, 2010). O Butilenoglicol Cocoate (Cocoate BG®), é um emoliente utilizado na formulação, é solubilizante de filtros orgânicos e possui alta capacidade de dispersão de pigmentos (GATTEFOSSÉ, 2015). Promove emoliência à formulação, favorecendo a espalhabilidade e toque final seco.

3.6.4 Silicones

Alguns silicones, além de melhorar as propriedades sensoriais dos cosméticos para a pele, podem contribuir com o aumento da resistência à água de formulações de fotoprotetores (RIBEIRO,2010). Os silicones utilizados no estudo foram da Dow Corning®, silicone DC 245® (volátil) e silicone DC 9040® (elastômero de silicone).

3.7 Estabilidade de Emulsões

Considerando que as emulsões são os veículos mais utilizados na formulação de fotoprotetores, é importante compreender como estabilizá-las e o que acontece quando ocorre a perda dessa estabilidade.

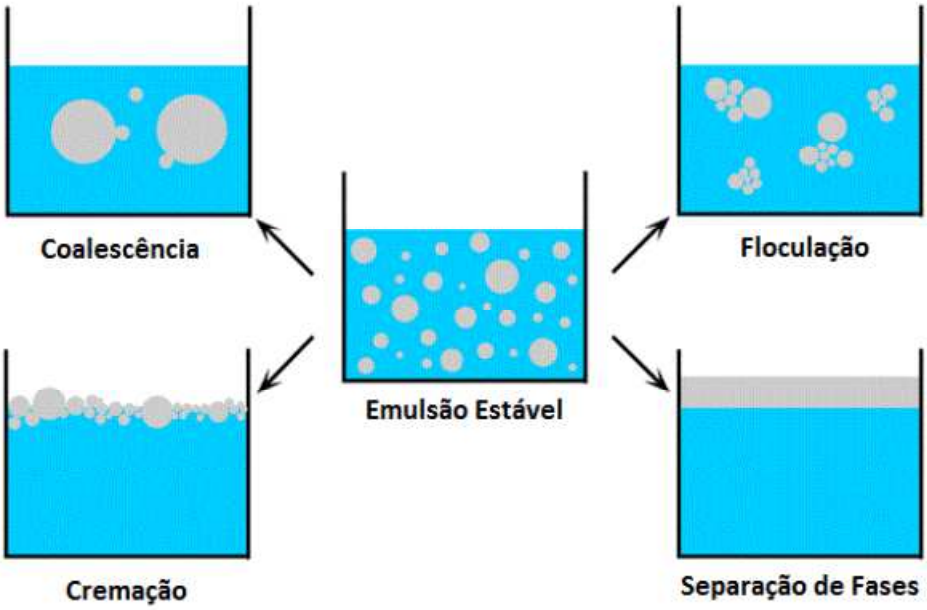
São necessárias algumas condições para que as emulsões tenham estabilidade:

- Tensão superficial baixa: a adsorção de surfactantes (emulsificantes) nas interfaces óleo-água diminui a energia interfacial, facilitando o desenvolvimento e aumentando a estabilidade das grandes áreas interfaciais associadas com as emulsões;

- Filme interfacial mecanicamente forte e elástico: a estabilidade das emulsões é favorecida pela proteção mecânica dada pelo filme adsorvido ao redor da gota.
- Repulsão das duplas camadas elétricas: a repulsão entre as partículas diminui os choques, evitando a floculação. Quando agentes emulsificantes iônicos são usados, a repulsão da dupla camada elétrica lateral pode prevenir a formação de filmes compactos.
- Volume pequeno da fase dispersa: favorece a formação de gotículas pequenas;
- Tamanho de gotículas: gotas grandes são menos estáveis devido a sua menor razão de área/volume, que aumentam a tendência da gota crescer;
- Viscosidade: quando a viscosidade encontra-se alta, diminui as colisões retardando a floculação e sedimentação. A avaliação da viscosidade aparente está relacionada à estabilidade física da formulação, sendo que a redução dos valores de viscosidade indica desestabilização (MASMOUD et al, 2005).
- Espalhabilidade: definida como a expansão de uma formulação semi-sólida sobre uma superfície após determinado período de tempo (BORGHETTI, KNORST, 2006). Em fotoprotetores a boa espalhabilidade é extremamente importante, uma vez que está relacionada ao modo de aplicação e devem promover uma camada uniforme na pele para garantir o FPS (RIGON, 2013).
- Condutividade: pode ser utilizada para determinar a natureza das emulsões; é dependente de sua fase externa, se for O/A será boa condutora, mas se for A/O será uma má condutora. É frequentemente utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões por meio da integridade da fase externa, principalmente quando a formulação é armazenada por longos períodos (MASMOUDI at al, 2005).
- pH: O acompanhamento dos valores de pH durante o estudo de estabilidade fornece informações a respeito da estabilidade química da formulação, ou seja, decréscimos desses valores podem estar relacionados à oxidação da fase oleosa com a formação de cadeias oxidadas ou ainda a hidrólise de triglicerídeos, manifestada pela formação de ácidos graxos livres, decomposição química dos componentes ou formação de compostos indesejáveis. A determinação dos valores de pH também é importante para avaliar interação entre componentes da formulação e veiculação de ativos pH dependentes (MASMOUDI et al., 2005; BOOCK, 2007).

A instabilidade física das emulsões pode ser visualizada através de quatro fenômenos principais: floculação, cremagem, coalescência e separação de fases (Figura 6). A floculação é a agregação reversível das gotículas da fase interna: é a primeira fase de alteração da estabilidade das emulsões. Após, ocorre a cremação, que consiste na agregação dos flóculos previamente originados, constituindo uma camada disposta na superfície ou no fundo do frasco. Ainda que seja um processo reversível por meio de agitação, a sua ocorrência, além de ser sinal de instabilidade da emulsão, é esteticamente inaceitável, podendo inclusive afetar a concentração de ativos. Já a coalescência ocorre com a aproximação das gotículas formando gotículas maiores, sendo um processo irreversível que culmina com a separação de fases ("quebra da emulsão"). A floculação e a coalescência são etapas muito semelhantes, diferindo apenas pelo fato de na floculação o filme interfacial permanecer intacto, enquanto que na coalescência esse é rompido (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; PRISTA et al, 1995; AULTON, 2005).

Figura 6 - Fenômenos de instabilidade física em emulsões



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

Alguns fatores podem contribuir para que ocorra a coalescência, como: adição de uma substância que seja incompatível com o agente emulsificante; crescimento bacteriano; mudança de temperatura - aquecimento acima de 70 ºC, congelamento e fatores que provocam

o rompimento do filme interfacial que cerca as gotículas (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007).

3.8 Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras

Para um ativo ser aprovado pela Anvisa como fotoprotetor de uso tópico, uma série de estudos devem ser conduzidos, como: ensaios toxicológicos, toxicidade subcrônica, permeação cutânea, irritação da pele ou mucosas, fotossensibilização, mutagenicidade e fotomutagenicidade, estes são os testes de segurança.

Os ativos constantes da Tabela 1 (item 3.2 já citado) são livres de toxicidade sistêmica e carcinogênese, quando usados topicamente e nas concentrações recomendadas (SCHALKA et al, 2014).

O FPS é um importante parâmetro de avaliação da eficácia de um produto com fotoproteção, sendo mundialmente aceito. Seu princípio baseia-se na determinação da Dose Eritematosa Mínima (DEM), definida como sendo a menor quantidade de energia necessária para o desencadeamento de eritema, em áreas de pele protegidas e não protegidas pelo produto em estudo. As metodologias para determinação do FPS seguem o preconizado pelo FDA (*Food and Drug Administration Agency* – órgão regulatório americano) e pela COLIPA (órgão com sede em Bruxelas que representa a indústria europeia de cosméticos, perfumaria e higiene pessoal e trabalha em conjunto com as instituições europeias e ONGs - organizações não governamentais) (VELASCO et al., 2011).

Podem ser utilizadas metodologias *in vitro* e *in vivo*, sendo a primeira utilizada na fase de desenvolvimento e controle de processo e a segunda em voluntários humanos. A metodologia *in vitro* (utilizada pelo FDA) baseia-se na análise por transmitância do UV, onde a amostra a ser avaliada é aplicada sobre um substrato de pele sintética (3M, Transpore®, Vitro-Skin®). É então acoplado ao equipamento emissor de UVA e UVB, sendo parte da radiação retida pelos fotoprotetores presentes no produto e parte transmitida. O equipamento possui um detector que capta a radiação onde um programa calcula o FPS da formulação em teste (LABSPHERE, 2003; SHEU et al, 2003).

A metodologia *in vivo* do FDA e da COLIPA possuem muitos aspectos em comum e algumas diferenças (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação do Teste de Eficácia *In Vivo* segundo o órgão regulador

Parâmetro	FDA	COLIPA
Quantidade aplicada	2 cm²	2 cm²
Área do teste	1 cm²	1 cm²
Tempo para medição	22-24 h	20±4 h
Nº de voluntários	20 – 25 com pele tipo I, II e III*	10 ou mais com pele tipo I, II e III*
Fonte UV	Simulador solar arco Xe com emissão UV 290 – 400 nm, similar à luz solar, ao nível do mar com 16º incidência.	Fonte de luz UV artificial com emissão 290 – 400 nm, similar à luz solar na latitude 40ºN
Tempo de secagem antes da irradiação	15 min	15 min
Cálculo do FPS	Média Aritmética dos valores individuais.	Média Aritmética dos valores individuais.

***Classificação de Fitzpatrick**
Fonte:RIBEIRO, 2010

A classificação de Fitzpatrick se baseia nos tipos de pele em resposta à exposição ao sol numa escala de I a VI, sendo a pele tipo I a que sempre queima e nunca bronzeia (branco marfim), tipo II sempre queima, bronzeia muito pouco (branco), tipo III a pele que queima e bronzeia moderadamente (morena clara), tipo IV a pele que queima pouco e sempre bronzeia (morena moderada), tipo V a pele que raramente queima, mas sempre bronzeia (morena escura) e a tipo VI que nunca queima, mas bronzeia profundamente (negra) (ASTNER, ANDERSON, 2004).

Observa-se que os métodos são muito semelhantes (Tabela 2), sendo as diferenças basicamente com relação ao tempo para medição, o número mínimo de voluntários e o tipo de fonte de radiação UV.

Apesar da determinação do FPS ser considerada uma referência, existem controvérsias na literatura científica sobre sua proteção na prática (SCHALKA, REIS, 2011; RIBEIRO, 2010).O primeiro aspecto é com relação à quantidade aplicada pelo consumidor, que é bem inferior a utilizada no teste de eficiência, o que equivale a aproximadamente uma colher de chá. Além disso, o produto deve ser aplicado de 20 a 30 min antes da exposição ao sol para que se forme um filme protetor. Não sendo cumpridas essas recomendações, o produto não terá na prática o FPS declarado na embalagem, deixando de cumprir com seu objetivo. No sentido de solucionar esse problema, Cabral, Pereira e Partata (2013) propõem um aconselhamento farmacêutico aos usuários de formulações fotoprotetoras.

Outra questão é com relação ao valor do FPS. Enquanto alguns pesquisadores entendem que um FPS 15 é o suficiente para proteger das radiações, existem outros que defendem valores superiores. É necessário refletir que um FPS 15, por exemplo, bloqueia em torno de 92% da radiação, enquanto um FPS 30 bloqueia 96,7% e um FPS 70 em torno de 98,6%. Esses dois últimos possuem valores muito próximos, além de necessitar de uma concentração muito maior de ativos para obter um FPS 70, o que pode acarretar maior potencial alergênico.

Na prática, os produtos com FPS mais alto, possuem um forte apelo pelo fato das pessoas utilizarem de forma inadequada. Desse modo, para obter um resultado semelhante a FPS 15, é necessário utilizar, por exemplo, um FPS 50 (SUMMER et al, 1997).

3.9 Recomendações do Consenso Brasileiro em Fotoproteção (SBD)

No sentido de harmonizar as condutas profissionais, o Consenso Brasileiro em Fotoproteção elaborou as seguintes recomendações (SCHALKA et al, 2014): é importante a classificação de fotoprotetores como produtos cosméticos para que os consumidores tenham um maior acesso; todos os ativos reconhecidos pela Anvisa têm segurança e eficácia, se usados da forma adequada; não há nenhuma evidência até o momento sobre o risco da utilização de nanopartículas inorgânicas como filtros solares em produtos de uso tópico; para efeito de registro de formulações fotoprotetoras, devem ser realizados estudos de segurança em conformidade com a legislação da Anvisa; podem ser adicionados antioxidantes nas formulações desde que se comprove o benefício, além da necessidade de testes de eficácia; a RDC 30, de 2012, que trata sobre fotoproteção, possui metodologia mais atualizada, de acordo com as agências regulatórias internacionais (BRASIL, 2012); a SBD concorda com a proibição do termo "bloqueador solar" ou qualquer outro termo que sugira proteção total, que poderia levar o usuário a uma falsa sensação de segurança absoluta; a SBD recomenda que os dermatologistas prescrevam formulações fotoprotetoras que estejam de acordo com as normas da ANVISA.

3.10 Estabilidade de Fotoprotetores

No Brasil o documento norteador do estudo de estabilidade de formulações fotoprotetoras é o Guia de Estabilidade de Cosméticos, produzido pela Anvisa (BRASIL, 2004). O documento orienta o estudo de forma ampla informando sobre a estabilidade de

cosméticos de modo geral, as formas de conduzir o estudo dependendo da finalidade, a relação do cosmético com a embalagem, interações dos componentes da formulação, armazenamento e prazo de validade.

Estabilidade é um parâmetro que visa determinar se uma amostra mantém-se quimicamente inalterada numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (BRASIL, 2003). Diz-se que um produto está estável quando mantém suas características originais até o final do prazo de validade.

Os testes de estabilidade devem ser feitos: durante o desenvolvimento de novas formulações; quando ocorrerem mudanças significativas no processo de fabricação; para validar novos equipamentos ou processo produtivo; quando houver mudanças significativas nas matérias-primas do produto ou no material de acondicionamento.

Vários fatores podem afetar a estabilidade da formulação como os componentes da mesma e suas interações, o processo de fabricação, material de acondicionamento, condições ambientais e de transporte. As alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos, ou intrínsecas, quando por fatores inerentes à formulação. A estabilidade pode ser considerada também do ponto de vista físico, químico ou microbiológico (BRASIL, 2004).

É importante que os testes sejam feitos sob condições que permitam fornecer informações no menor tempo possível, desse modo as amostras devem ser armazenadas em condições que acelerem os processos, porém não de modo tão extremo que não correspondam a realidade. É sugerido conduzir os testes na sequência: preliminares, acelerados e de prateleira, para que se possa avaliar a formulação em etapas e desse modo detectar qual momento ocorre a perda de sua estabilidade.

Antes de iniciar o estudo de estabilidade sugere-se centrifugar as amostras a 3000 rpm durante 30 min; se o produto permanecer estável pode ser feito o estudo, caso contrário deve ser reformulado.

No estudo de estabilidade preliminar são utilizados ciclos de aquecimento e resfriamento com períodos pré-determinados, duração de 15 dias e com o objetivo de auxiliar na triagem das formulações.

No estudo de estabilidade acelerada são também utilizados ciclos de aquecimento e resfriamento com períodos maiores pré-determinados, em geral de 90 dias, podendo se estender para seis meses a um ano.

Nessa etapa as amostras também são submetidas à exposição de radiação luminosa utilizando lâmpadas de xenônio ou fontes de luz ultravioleta. Os parâmetros avaliados nessa e na etapa anterior são características organolépticas (aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável), características físico-químicas (valor de pH, viscosidade, densidade, etc) e características microbiológicas.

As características organolépticas determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor, ou seja, as análises macroscópicas têm como objetivo garantir que possíveis alterações não tragam qualquer perda de benefício ou segurança ao mesmo.

Apolinário et al (2013) avaliaram a estabilidade de formulações utilizando o planejamento fatorial 2^3, onde foi avaliada a influência de bases auto-emulsionantes e emolientes em fatores como pH, condutividade, tamanho de gotícula, espalhabilidade e FPS. Os pesquisadores concluíram que a concentração da cera auto-emulsionante influenciou no tamanho de gotícula e espalhabilidade das formulações, estando esses fatores relacionados a estabilidade das formulações. O tipo de cera auto-emulsionante exerceu influência significativa na condutividade das formulações.

Smaoui et al (2013) avaliaram a estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo os filtros solares benzofenona-3, etil metoxicinamato e dióxido de titânio em diferentes porcentagens. As formulações foram armazenadas durante quatro semanas a 8, 25 e 40ºC, tendo sido determinado pH e FPS. Além disso, foi também avaliada a estabilidade microbiológica e a qualidade organoléptica. Os autores observaram que a formulação com 7% de benzofenona-3, 7% etilhexil metoxicinamato e 6% de dióxido de titânio apresentou maior estabilidade físico-química e microbiológica.

Borghetti e Knorst (2006) desenvolveram e avaliaram a estabilidade física de formulações fotoprotetoras contendo 6% de octil metoxicinamato ou metil benzilideno cânfora durante o armazenamento em temperatura ambiente por seis meses. Durante este período as formulações foram avaliadas quanto às suas características macroscópicas, viscosidade, comportamento reológico, índice de óleo, espalhabilidade e FPS. Os resultados mostraram que os valores de FPS foram significativamente maiores para a formulação contendo metil benzilideno cânfora ($P < 0,05$). Em contrapartida, a formulação contendo octil metoxicinamato apresentou valores de espalhabilidade significativamente maiores ($P < 0,05$) e de viscosidade significativamente menores ($P < 0,05$).

3.11 Principais componentes dos fotoprotetores deste estudo

Os componentes das formulações que foram utilizados como variáveis independentes (Dry Flo®, Cocoate BG®, Emulium 22® e Olivem 900®), estão descritos a seguir.

A escolha destes ativos segue tendência do mercado de cosmetologia na busca de produtos de origem natural, sendo um deles com certificação de produto orgânico por ser mais seguro em termos de toxicidade e por atender o quesito de sustentabilidade ambiental. Com foco no sensorial, optou-se por ativos que conferissem toque leve e sedoso ao produto final, característica muito requerida pelos consumidores atualmente.

Formular fotoprotetor de boa aceitação é um desafio, considerando que as formulações são ricas em filtros solares oleosos, podendo levar a um produto de toque final pesado. Conhecendo a exigência do consumidor na busca de fotoprotetores eficazes com alta espalhabilidade, toque final seco e sem residual branco na pele foram escolhidos ativos que oferecessem essas características. Emulium 22®, proveniente da castanha do Pará, possui excelente perfil de tolerância na pele, alta estabilidade em temperaturas elevadas. Já o Olivem 900®, derivado do óleo de oliva, possui certificado Ecocert, certificação orgânica por órgão especializado, melhora a espalhabilidade e a performance sensorial.

O Cocoate BG®, derivado do coco, emoliente com excelente miscibilidade com filtros solares orgânicos, confere melhor espalhabilidade e toque seco ao produto final.

As características sensoriais são tão importantes para o consumidor quanto os testes de eficácia e segurança, sendo a motivação para compra ou continuidade no uso do produto, por isso os efeitos na reologia e nas características organolépticas foram levados em consideração na escolha destes ativos. O Dry Flo®, polímero derivado do amido, também confere melhoria na espalhabilidade e toque sedoso ao produto.

3.11.1 Dry Flo®

Quimicamente é o "aluminium starch octenylsuccinate", segundo o INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredient) (Figura 7). É um polímero derivado do amido, um sal de alumínio produzido pela reação de anidrido octenilsuccínico com amido (RIGON, R.B. et al, 2013).

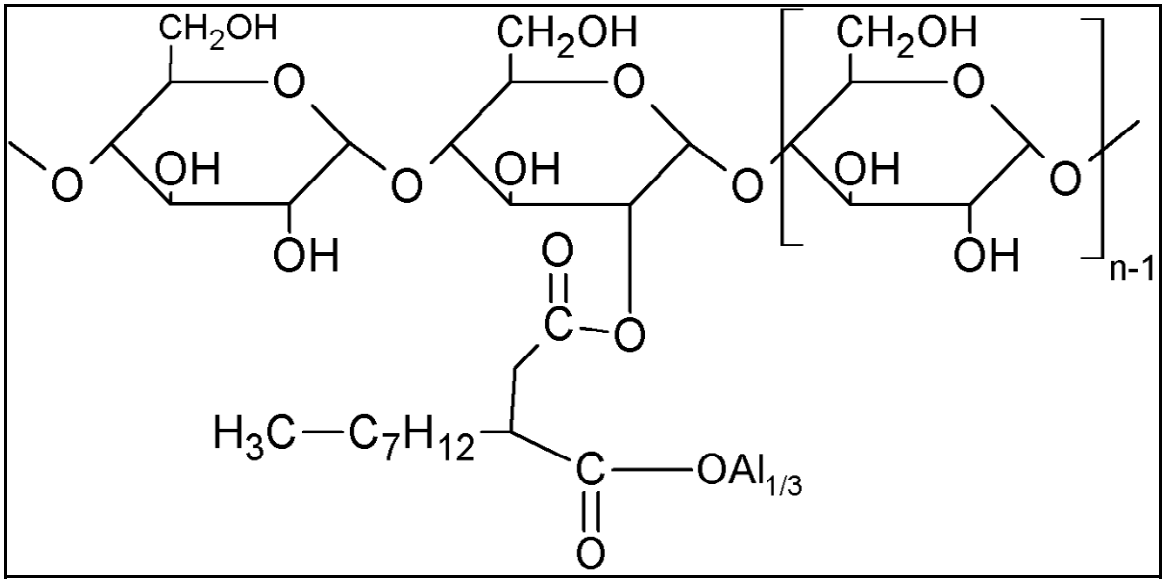
Possui um aspecto de pó fino branco, de fluxo livre, com partículas uniformes e hidrofóbico, sendo utilizado como modificador de sensorial em emulsões e formulações à

base de água, bem como pomadas e formulações anidras. Melhora a espalhabilidade na pele e reduz a oleosidade da formulação.

É utilizado nas concentrações de 1 a 10% em emulsões aquosas, de 5 a 50% em pós secos e a partir de 30% em pomadas (DRY FLO TM PURE, 2015).

O Dry Flo® foi estudado em formulações fotoprotetoras, tendo sido capaz de produzir suavidade e toque aveludado, diminuindo notadamente a oleosidade da pele, além de melhorar a espalhabilidade e toque seco. Desse modo, melhorou as características sensoriais, aumentando a aceitação do consumidor (RIGON et al, 2013).

Figura 7 – Estrutura química do "aluminium starch octenylsuccinate"

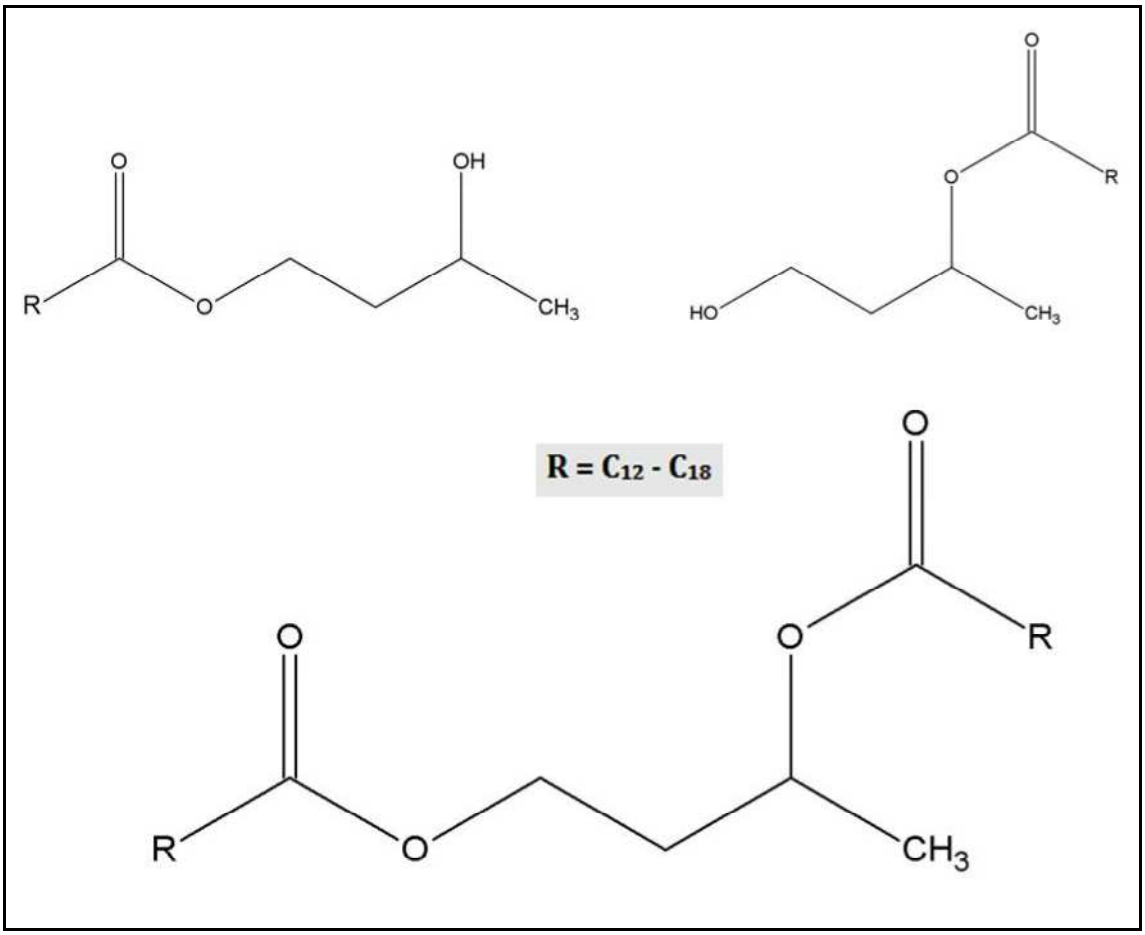


Fonte: ELABORADO PELA AUTORA

3.11.2 Cocoate BG®

Segundo o INCI, o Cocoate BG® é chamado de butylene glycol cocoate. É uma mistura de ésteres de ácidos graxos do coco com 1, 3 – butanediol (ou ácido dodecanóico, monoésteres com 1,2-butanediol) (Figura 8). Trata-se de um líquido viscoso, incolor ou levemente amarelado, oleoso, estável ao ar à temperatura ambiente. É miscível em dissulfeto de carbono, clorofórmio, éter de petróleo e imiscível em água (BERGFELD et al, 2008). Além disso, ele possui ação emoliente e solubilizante do filtro solar em loções fotoprotetoras cujas descrições foram relatadas pela GATTEFOSSÉ (2015a).

Figura 8 – Estruturas do Cocoate BG

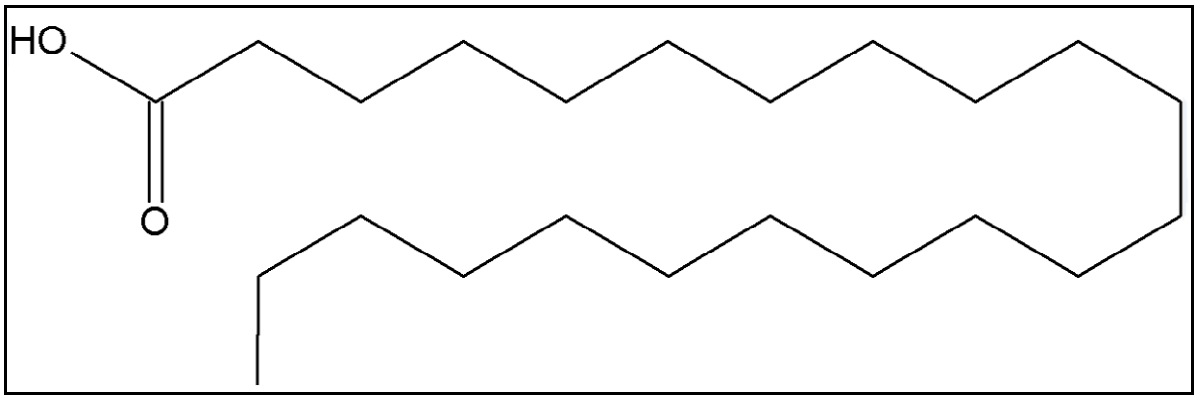


Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

3.11.3 Emulium 22®

O Emulium 22® é uma base emulsionante derivado do ácido behênico, também chamado de ácido docosanóico, um ácido graxo saturado com 22 carbonos de cadeia linear (Figura 9), de fórmula química $C_{21}H_{43}COOH$, sendo o principal componente do óleo de Ben, que é extraído das sementes da acácia-branca (*Moringa oleifera*), encontrando-se também na castanha do pará (*Bertholletia excelsa H.B.K.*). A sua aparência é um cristal ou pó de cor branca ou cremosa. Seu ponto de fusão é 74-78°C e o seu ponto de ebulição é 306°C

Figura 9 – Estrutura química do ácido behênico



Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

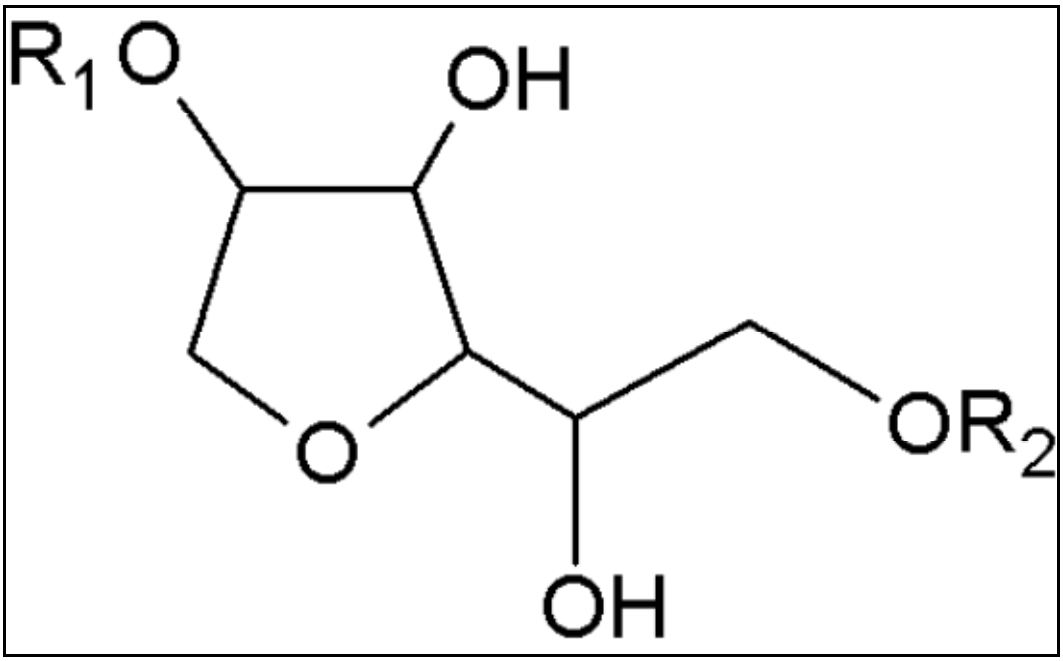
O Emulium 22® é quimicamente o "Tribehenin PEG-20 Esters", sendo usado na concentração de 2 a 6%, em pH 3 a 8. É uma base emulsionante O/A, não iônica, que produz loções e cremes extremamente estáveis, compatível com óleos e ativos usados em cosméticos, bem adaptado à pele e ao sol. Possui toque seco, com boa espalhabilidade.

3.11.4 Olivem 900®

Olivem 900® é quimicamente o oleato de sorbitano, derivado do sorbitano (uma mistura isomérica de compostos orgânicos obtidos a partir da desidratação de sorbitol) (MARTINDALE, 2009) (Figura 10), uma base emulsificante natural não iônica e extraído do óleo de oliva (fruto da *Olea europaea* L.), Atua como modificador reológico de emulsões, com toque leve e sedoso, não confere untuosidade e pegajosidade, mesmo que a quantidade de óleo e substâncias oleosas sejam altas na formulação (OLIVEM 900, 2015).

Recomendado seu uso nas concentrações entre 6 a 7% (único emulsionante), 1 a 2% (co-emulsionante O/A) e 2 a 3% (co-emulsionante A/O).

Figura 10 – Estrutura do sorbitano



Podem ocorrer substituições em R_1 e/ou R_2.

Fonte:ELABORADA PELA AUTORA

3.12 Análise estatística na otimização de processos e produtos

A história da qualidade relata que os conceitos estatísticos assumiram um papel importante nas empresas. Segundo Chew (1957), estatística é a arte de adquirir conhecimento através da coleta, análise e interpretação de informações (GALDAMÉZ, 2002).

Um estudo realizado pela ASQ (American Society for Quality) sobre o futuro da qualidade para as primeiras duas décadas do século XXI, ressalta que "a busca da qualidade deve mudar, tornar-se mais inovativa, flexível e rápida na implementação das soluções eficazes que conduzam a resultados nos negócios e reflitam os desejos do consumidor".

Praticamente em todas as áreas do conhecimento o uso da estatística, em especial das técnicas de planejamento de experimentos, são imprescindíveis para as tomadas de decisão visando avaliar novos procedimentos ou otimizar processos. O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que pode ser utilizada para avaliar a influência de variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, otimizando assim o desenvolvimento de formulações e, principalmente, reduzindo tempo e custo, fatores importantes na gestão dos processos produtivos (RODRIGUES, M.I., LEMMA, A.F., 2014)

A metodologia de superfícies de resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A análise de superfície de resposta é complementar ao planejamento fatorial, determinando as condições ótimas (ou níveis ótimos) dos fatores de controle que interferem na resposta de um sistema (GALDAMÉZ, 2002). Neste estudo, o uso dessas ferramentas possibilitou o planejamento consciente dos experimentos, determinando a influência das variáveis sobre as respostas desejadas com mais assertividade, ao invés de procedimento de tentativa e erro.

4 Desenvolvimento e Caracterização das Formulações Fotoprotetoras

4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

4.1.Metodologia

4.1.1 Matérias-primas

Para as formulações em estudo foram utilizadas as seguintes matérias-primas: Carbopol 940 Carbômero, Pemulen TR2 (emulsionante polimérico de ácido poliacrílico), Bemotrizinol, Metoxicinamato de octila, Benzofenona 3, salicilato de octila, avobenzona, metilbenzilideno cânfora, EDTA (Etilenodiamino) dissódico, BHT (Butil-hidroxi tolueno), Trietanolamina, Phenonip® (Fenoxietanol, Metil etil propil butil parabenos), Eumulgin B2 (Ceteareth-20®), Antaron V216® (Copolimero de Vinilpirrolidona), Propilenoglicol, Silicone ciclometicone, Elastômero de silicone, Emulium 22® (Tribehenin PEG-20 Esters), Cocoate BG® (Butilenoglicol Cocoate), Olivem 900® (Sorbitan olivate) e Dry Flo® (Aluminium Starch Octenylsuccinate).

4.1.2 Planejamento fatorial e análise de superfície de respostas

Para avaliar a influência das três variáveis independentes - tipo de cera (Emulium 22® ou Olivem 900®), emoliente (Cocoate BG®) e agente modificador de sensorial (Dry Flo®) sobre as variáveis dependentes (pH, condutividade, viscosidade, FPS e tamanho de gotícula), elaborou-se um planejamento fatorial do tipo 2^3 (3 fatores em 2 níveis), totalizando 8 formulações expressos os valores reais e os níveis dos fatores estudados (Tabela 3). As faixas estudadas nesse planejamento fatorial foram definidas tendo como base valores informados pelos fornecedores das matérias-primas e pela literatura em geral.

Tabela 3 – Valores Reais e os Níveis dos Fatores para o Planejamento Fatorial 2^3

Fatores	Níveis	
	-1	+1
Tipo de cera: Emulium 22® ou Olivem 900®	2%(E)	2%(O)
Emoliente: Cocoate BG®	2%	4%
Modificador de sensorial: Dry Flo®	2%	4%

Fonte: ELABORADA PELA AUTORA
(E)- Emulium 22, (O)- Olivem 900

As formulações foram manipuladas utilizando a farmacotécnica de inversão de fases em duplicatas (réplicas) e de forma aleatória (exigências do método estatístico), conforme matriz do planejamento fatorial apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz do Planejamento Fatorial

Formulações	Dry Flo®	Emulium 22 ou Olivem 900®	Cocoate BG®
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

A Tabela 5 apresenta as composições das formulações elaboradas por planejamento fatorial, que foram denominadas F1 a F8.

Tabela 5 - Especificações das Formulações desenvolvidas por Planejamento Fatorial

COMPONENTES	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
Carbopol 940	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Pemulen TR2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Tinosorb S	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Metoxicinamato de octila	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Benzofenona 3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Salicilato de octila	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Avobenzona	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Metilbenzilideno cânfora	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
EDTA dissódico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Trietanolamina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Phenonip	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eumulgin B2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Antaron V 216	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Propilenoglicol	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Silicone ciclometicone	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Elastômero de silicone	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Emullium 22	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0
Olivem 900	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0
Cocoate BG	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Dry Flo	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0
Água purificada q.s.p	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Os valores apresentados na tabela estão em percentual (%)
Fonte: ELABORADA PELA AUTORA

As emulsões foram preparadas pela técnica de inversão de fases, aquecendo-as separadamente, sendo a fase aquosa (1) vertida lentamente sob a oleosa (2), ambas a 70ºC e sob agitação mecânica constante (agitador mecânico Fisaton - modelo 713 D) a 600 rpm até completo arrefecimento. Os silicones, conservante e modificador de sensorial foram acrescidos a 30ºC devido ao caráter termossensível dos mesmos, sendo

esta denominada “a frio” (3). A água utilizada na preparação das formulações foi obtida por osmose reversa. As formulações foram produzidas em laboratório com condições de umidade e temperatura monitoradas, seguindo as boas práticas de manipulação (BRASIL, 2007). Os componentes das formulações e suas funções são apresentados na Tabela 6.As formulações F9-F16 são o “espelho” de F1-F8.

Tabela 6 – Composição Quali-Quantitativa das Formulações

COMPONENTES	FUNÇÃO	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
1-Carbopol 940	Espessante	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
1-Pemulen TR2	Tensoativo	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
2-Tinosorb S	Filtro solar UVA UVB	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2-Metoxicinamato de octila	Filtro solar UVA UVB	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
2-Benzofenona 3	Filtro solar UVB	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2-Salicilato de octila	Filtro solar UVB	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
2-Avobenzona	Filtro solar UVA	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
2-Metilbenzilideno cânfora	Filtro solar UVB	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
1-EDTA dissódico	Quelante	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2-BHT	Antioxidante	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1-Trietanolamina	Alcalinizante	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
3-Phenonip	Conservante	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2-Eumulgin B2	Emulsionante	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2-Antaron V 216	Formador de filme e resistência a água	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1-Propilenoglicol	Emoliente	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3-Silicone ciclometicone	Modificador de sensorial	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
3-Elastômero de silicone	Modificador de sensorial	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
2-Emullium 22®	Cera autoemulsionante	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0
2-Olivem 900®	Cera autoemulsionante	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	2,0	2,0
2-Cocoate BG®	Emoliente	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0
3-Dry Flo®	Modificador de sensorial	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0
1-Água purificada q.s.p	Veículo	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Os valores apresentados na tabela estão em percentual (%) **Fonte: ELABORADA PELA AUTORA**

4.1.3 Caracterização Físico-Química das Formulações

4.1.3.1 Análise macroscópica

Nessa etapa foram avaliadas características organolépticas (cor, odor) e homogeneidade (presença de sedimentação, coalescência, alterações de cor) das formulações a fim de identificar instabilidade visível (BRASIL, 2004).

As amostras foram classificadas segundo os critérios a seguir: a) Normal, sem alteração (N); b) Levemente modificada (LM); c) Modificada (M); d) Intensamente modificada (IM).

4.1.3.2 Tamanho de gotículas

O tamanho de gotícula foi avaliado utilizando a metodologia adaptada de Coelho (2005) (contagem de 200 gotículas) , sendo a amostra diluída em solução aquosa de propilenoglicol (1:1), adicionando em um copo de béquer 0,5g da formulação em 10 mL da solução de propilenoglicol, até completa homogeneização.

A amostra foi colocada sob uma lâmina com lamínula e observada em microscópio Hirox (modelo Digital Microscope KH-7700, aumento de 700x).

4.1.3.3 Determinação do pH

A determinação do pH das formulações foi realizada com as amostras dispersas em água purificada obtida por osmose reversa (10% m/v), a 25 ºC, utilizando pHmetro (Gehaka modelo PG 1800) e eletrodo de solução FC09 calibrado com soluções pH 4,0 e 7,0. O teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2010).

4.1.3.4 Determinação da condutividade

A determinação da condutividade foi realizada em amostra dispersa em água purificada obtida por osmose reversa (10% m/v) a 25 ºC, em condutivímetro (Hanna- PWT), em triplicata com os valores dados em $\mu S/cm^2$, aferida com uma solução padrão 146,9 WS (marca MS Tecnopon).

4.1.3.5 Determinação do fator de espalhabilidade

A determinação do fator de espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991). Foi utilizada uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm), posicionada sobre escala milimetrada com uma fonte luminosa. A amostra foi introduzida no orifício da placa-molde e a superfície nivelada com espátula. A placa-molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada outra placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto. Os resultados foram expressos como espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação (1) (média de três determinações expressa em g/mm^2).

$$E_i = d^2 . p/4 \qquad \text{(Eq.1)}$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2);

d = diâmetro médio (mm).

Esse teste de espalhabilidade se baseia na resistência ao movimento forçado, onde os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite; essa relação corresponde ao fator de espalhabilidade.

4.1.3.6 Avaliação da viscosidade aparente

A viscosidade aparente das formulações foi avaliada com o auxílio de um viscosímetro rotacional Fungilab – Viscolead, com "spindle R7". O valor da velocidade de rotação empregado foi 100 rpm, sendo as leituras realizadas em três posições do frasco. Os resultados correspondem à média de três determinações, sendo os valores dados em cP. Os valores foram padronizados em 30% do valor de torque.

4.1.3.7 Determinação do fator de proteção solar (FPS)

O fator de proteção solar (FPS) foi determinado segundo metodologia *in vitro* proposta por Mansur *et al.* (1986), utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC, programa UV Probe.

As formulações foram diluídas com etanol 96º GL até a concentração final de 0,2 mg/mL. As absorvâncias das soluções foram determinadas na faixa de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm, tendo sido feitas três determinações para cada comprimento de onda.

O cálculo do FPS foi feito através da Equação 2.

$$FPS = FC.\sum_{290}^{320}. EE(\lambda) . 2 . I . Abs\cdot(\lambda) \qquad (Eq.\cdot 2)$$

Onde:

FPS= fator de proteção solar.

FC= fator de correção (=10), determinado de acordo com dois filtros solares de FPS. conhecidos de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato resultasse no FPS 4.

EE= efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ).

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

Abs (λ) = absorvância da solução da formulação contendo filtro solar no comprimento de onda (λ).

Os valores de EE (λ) e I(λ)(Tabela 7) foram previamente calculados (SAYRE et al, 1979).

Tabela 7 - Relação efeito eritemogênico (EE) e intensidade da radiação (I) conforme o comprimento de onda

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

4.1.4 Tratamento estatístico

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa computacional Statistica versão 7.0, e Teste de Tukey ($p<0,05$) pelo programa Assistat versão 7.7.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Análise macroscópica

A análise visual das formulações, 24 horas após a manipulação, revelou ausência de coalescência e floculação ou qualquer sinal de separação de fases nas formulações F1 a F6, apresentando cor branca levemente amarelada, odor característico e aspecto homogêneo, bem como em suas réplicas (F9 a F14). Já nas formulações F7 e F8, ocorreu separação de fases com coloração amarelada desde o momento da preparação; o mesmo se reproduziu em suas réplicas (F15 e F16) provavelmente caracterizando uma instabilidade física por não se misturarem nesta proporção. Ao analisar a composição dessas formulações (Tabela 3 - item 4.1.2), verificou-se que possuem Olivem 900 somado a uma concentração maior de Cocoate BG®. Provavelmente ocorreu uma incompatibilidade física entre os componentes Olivem 900® e Cocoate BG® quando este se encontra numa maior concentração, pois nas formulações que o possuíam na menor concentração a formulação permaneceu estável. As formulações F7 e F8 continuaram no estudo, porém, para atender a exigência estatística nos testes de Pareto e Análise de Superfície de Resposta.

4.2.2 Caracterização físico-química das formulações

Com a utilização da ferramenta planejamento fatorial, os dados foram analisados por gráficos tais como Pareto, análise de superfície de resposta e correlação de valores preditos e observados, a fim de investigar a influência das variáveis e a forma de interação entre elas.

As formulações F1 a F8 foram analisadas no tempo zero (T0) quanto ao pH, condutividade, fator de espalhabilidade, FPS, viscosidade aparente e tamanho de gotícula, todas em triplicata, com seus resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Variáveis respostas analisadas pelo Planejamento Fatorial (T0)

Formulação	pH	Condutividade ($\mu S/cm^2$)	Fator Espalhabilidade (g/mm^2)	FPS	Viscosidade aparente (cP)	Tamanho de Gotícula (µm)
F1	5,95 ± 0,02	99,10 ± 1,23	1,75 ± 0,28	26 ± 0,0	12328± 9,89	1,10 ±0,03
F2	5,82 ± 0,07	108,79 ± 10,01	1,79 ± 0,07	26 ± 1,41	12306±1,41	1.078± 0,007
F3	6,78 ± 0,04	120,62± 4,50	1,84 ± 0,10	26 ± 0,0	12278±8,48	1.111 ± 0,013
F4	6,03 ± 0,01	111,3± 0,32	1,85 ± 0,01	26 ± 0,0	12281±4,66	1,171 ± 0,075
F5	5,92 ± 0,01	98,77± 5,98	1,62 ± 0,41	27 ± 0,0	12242±135,7	1.099 ± 0,035
F6	6,71 ± 0,01	133,54± 1,60	1,64 ± 0,14	26 ± 0,7	12308±12,02	1.162 ± 0,021
F7	5,83 ± 0,02	99,62± 4,73	1,53 ± 0,28	30,5 ± 6,36	62821±833,6	1.205 ± 0,15
F8	5,91 ± 0,005	100,04± 0,61	1,51 ± 0,17	30,5 ± 3,53	63484±119,5	1.098± 0037

OBS.: Valor médio obtido de 3 determinações, sendo então calculada a média desse valor com sua réplica (n=2).

Os valores das variáveis respostas apresentados na Tabela 8 foram submetidos a tratamento estatístico análise de variância (ANOVA) gerando as Tabelas 9 a 14.

4.2.2.1 Variável Resposta pH

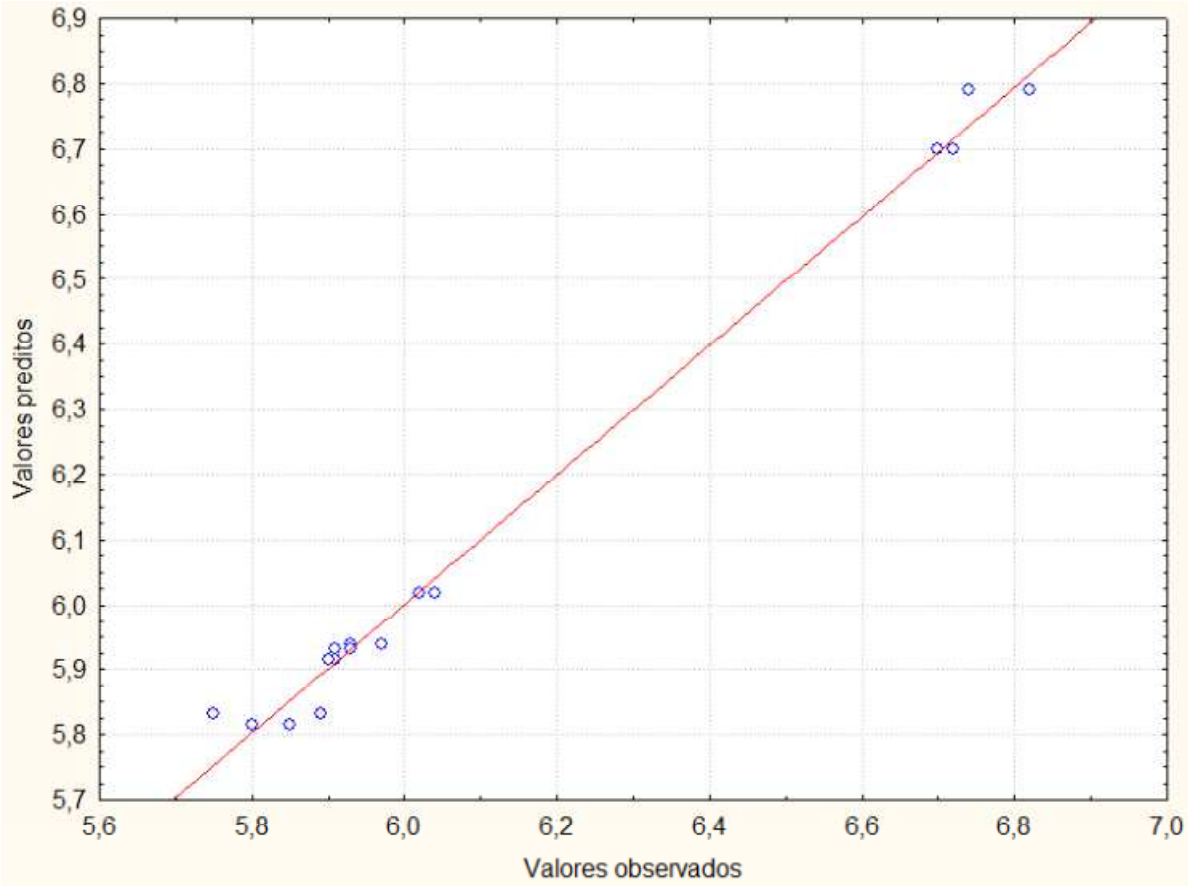
Na Tabela 9 são demonstrados os resultados da ANOVA para a variável resposta pH. Verificou-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,99, bem como a análise estatística mostrou que o valor $F_{calculado}$ (183,25) foi maior (54%) do que o valor do $F_{tabelado}$ (3,37), sendo os resultados significativos para o nível de confiança de 95%.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta pH no T0

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2,165775	6	0,3609	183,25
Resíduo (erro)	0,017725	9	$1,969 \times 10^{-3}$	
Falta de ajuste	0,002025	1	0,002025	1,03
Erro puro	0,015700	8	$1,9625 \times 10^{-3}$	
Total	2,183500	15		
R^2	0,992			
$F_{tabelado\ (6;9)} = 3,37$		$F_{tabelado\ (1;8)} = 5,32$		
F calculado ≥ F tabelado O modelo é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.		F calculado < F tabelado (falta de ajuste) Não há falta de ajuste		

Desse modo, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos conforme observado na Figura 11, que apresenta a correlação dos valores preditos *versus* observados, mostrando grande correlação pela disposição dos pontos ao longo da reta.

Figura 11 - Valores preditos e observados da variável pH



Para que a regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996) e os resultados demonstraram que o modelo foi bem ajustado para esta variável, sendo estatisticamente significativo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; SILVA, et al, 2008).

O pH da pele humana é considerado um importante indicador funcional e relacionado à produção de ácido láctico, que confere à superfície cutânea o que se convencionou por "manto ácido cutâneo" (IMOKAWA et al, 1989). Assim, a pele apresenta pH levemente ácido (4,6 a 6,0) (RODRIGUES, 1995; RODRIGUES, 1996), o que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam capacidade tamponante, garantindo assim o equilíbrio e mantendo a pele saudável.

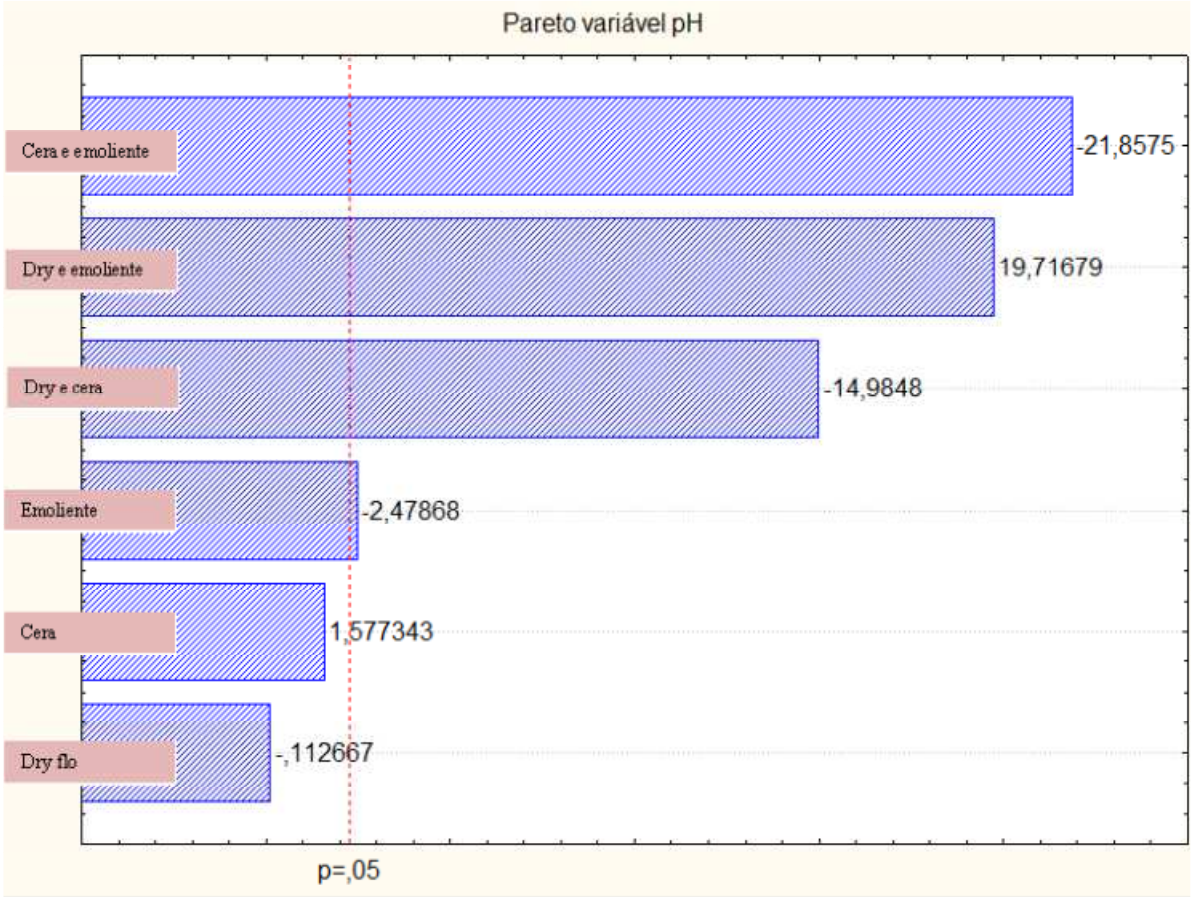
Desse modo, é desejável que as formulações tópicas (emulsões do tipo creme e loção) estejam dentro da faixa de pH fisiológico já citado, não modificando assim o equilíbrio

estabelecido. É necessário também que os componentes das formulações sejam estáveis nessa faixa de pH. Ribeiro (2010) cita que as bases emulsionantes aniônicas são instáveis em pH ácido, ao contrário das bases não iônicas (caso das utilizadas no presente estudo).

É importante assinalar que os valores de pH obtidos (5,8 a 6,7) mostraram que as formulações apresentaram valores levemente ácidos, compatíveis com pH fisiológico (4,6 a 6,0) (RODRIGUES, 1995; RODRIGUES, 1996). Desta forma, nenhuma das formulações foi descartada, porém o planejamento fatorial possibilitou obter o resultado das melhores formulações de acordo com a influência das variáveis.

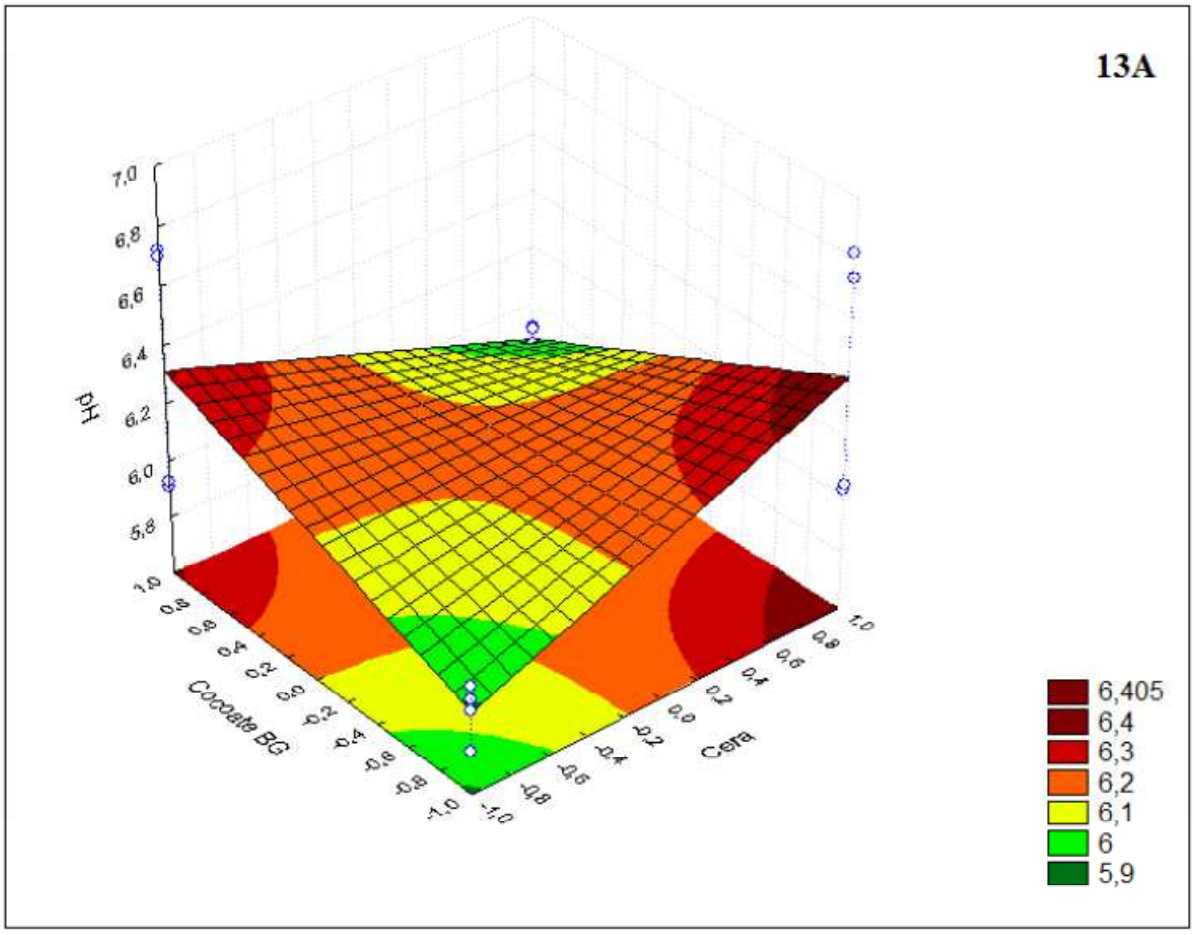
Em ato continuo, foi observado por intermédio do gráfico de Pareto (Figura 12) que individualmente as variáveis não influenciaram na resposta pH, porém houve influência quando estas interagiram, tais como Cera e Cocoate BG®, Dry Flo® e Cera, Dry Flo® e Cocoate BG®, sendo importantes para a obtenção das melhores formulações. As interações Cera e Cocoate BG®, Dry Flo® e Cera apresentaram valores negativos, então as melhores formulações para a variável pH foram obtidas para os menores valores de emoliente (nível -1) e a cera Emulium 22® (nível -1), fato que se repete com Dry Flo® (nível -1) e cera (nível -1) . Já a interação Dry Flo® e Cocoate BG®, que apresentou valor positivo, mostra que a melhor formulação é a que possui a maior concentração de Dry Flo® (nível +1) e menor concentração de Cocoate BG® (nível -1).

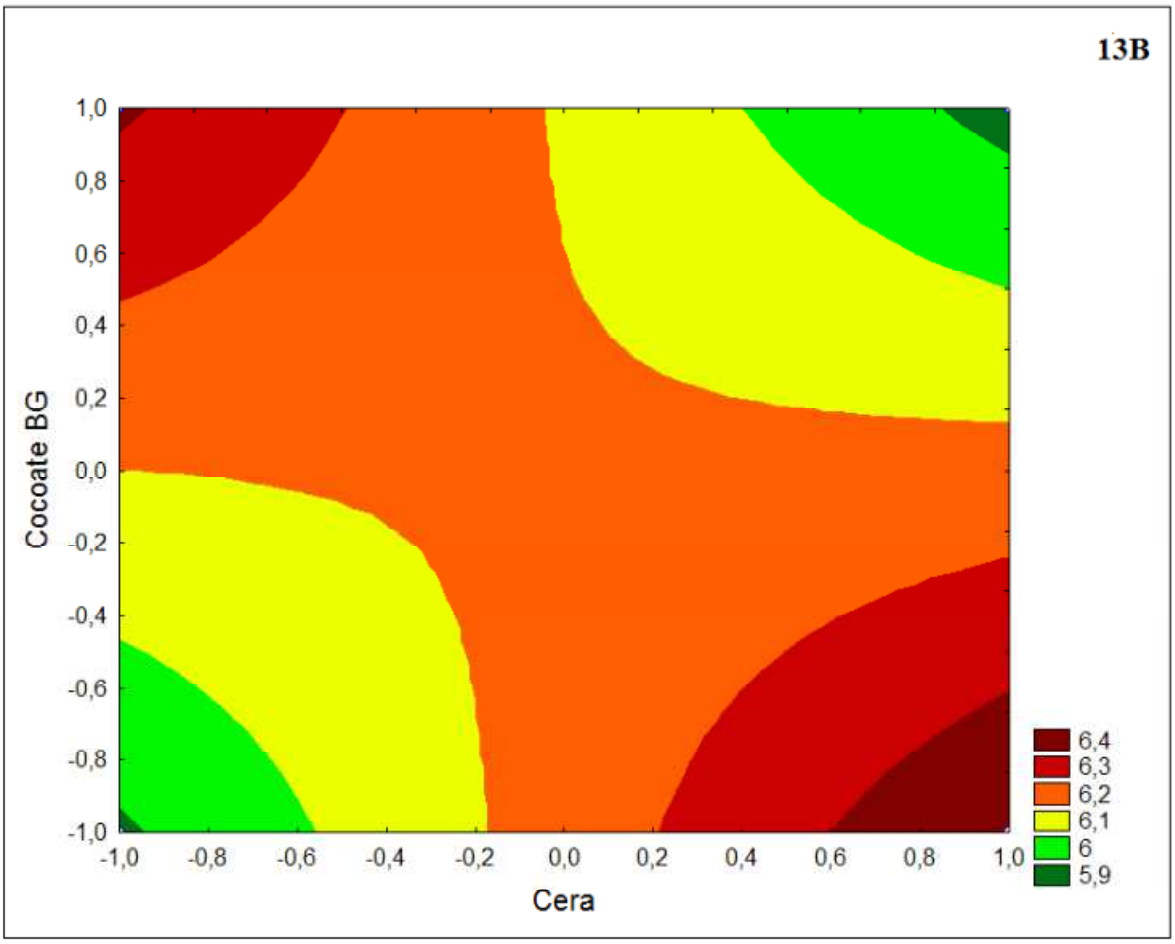
Figura 12 – Gráfico de Pareto da variável pH



Na Figura 12 são observadas as influências das variáveis independentes e suas interações, porém não informa em que nível se encontram essas variáveis, só podendo ser observado na superfície de resposta (Figura 13), que apresenta os efeitos da interação entre a cera e o Cocoate BG® sobre a resposta pH. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram a cera Emulium 22® (nível -1) e a menor concentração do Cocoate BG® (nível -1). Estes resultados correspondem às formulações F1 e F2.

Figura 13 - Efeitos da Cera e Cocoate BG® no pH

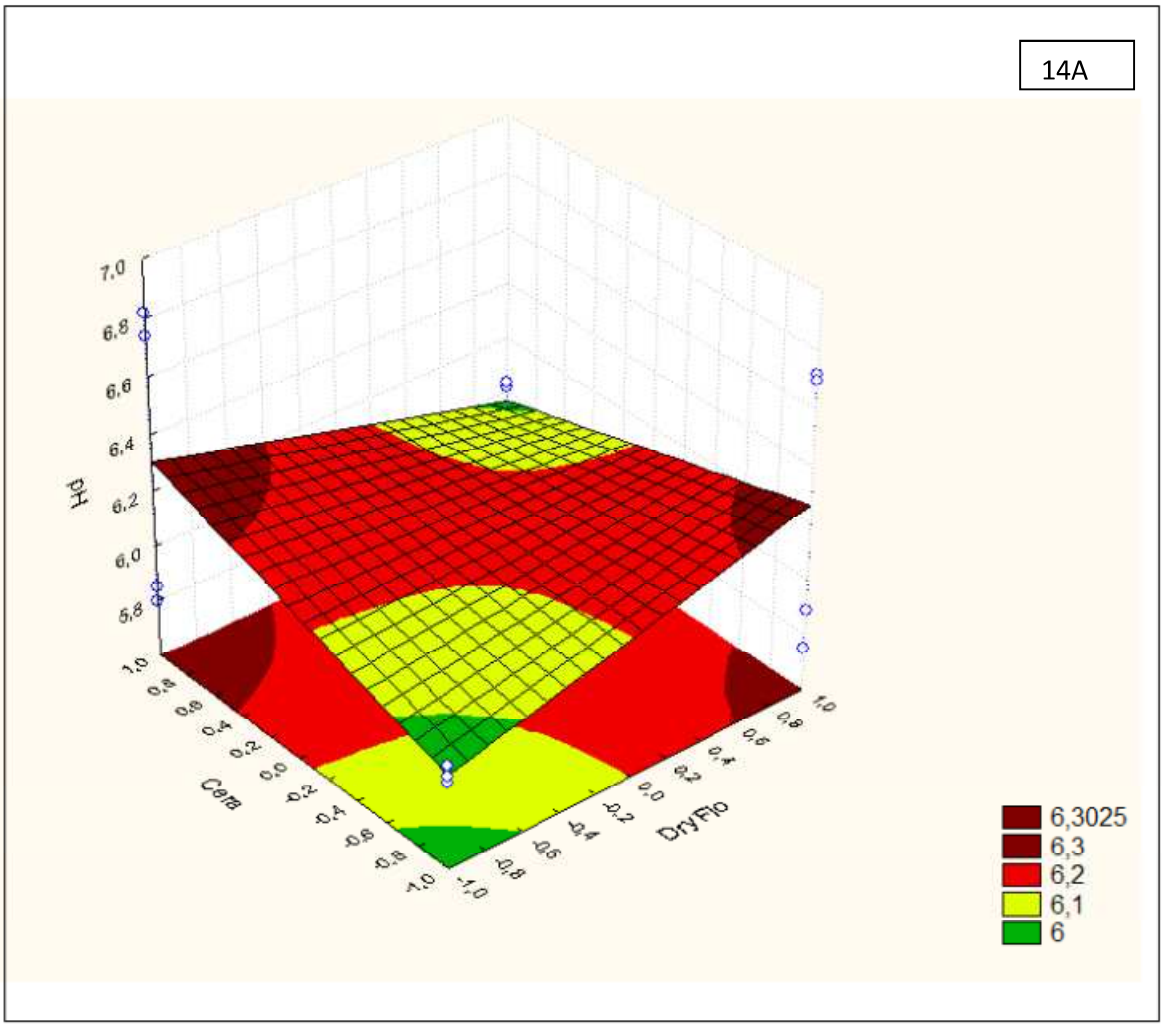


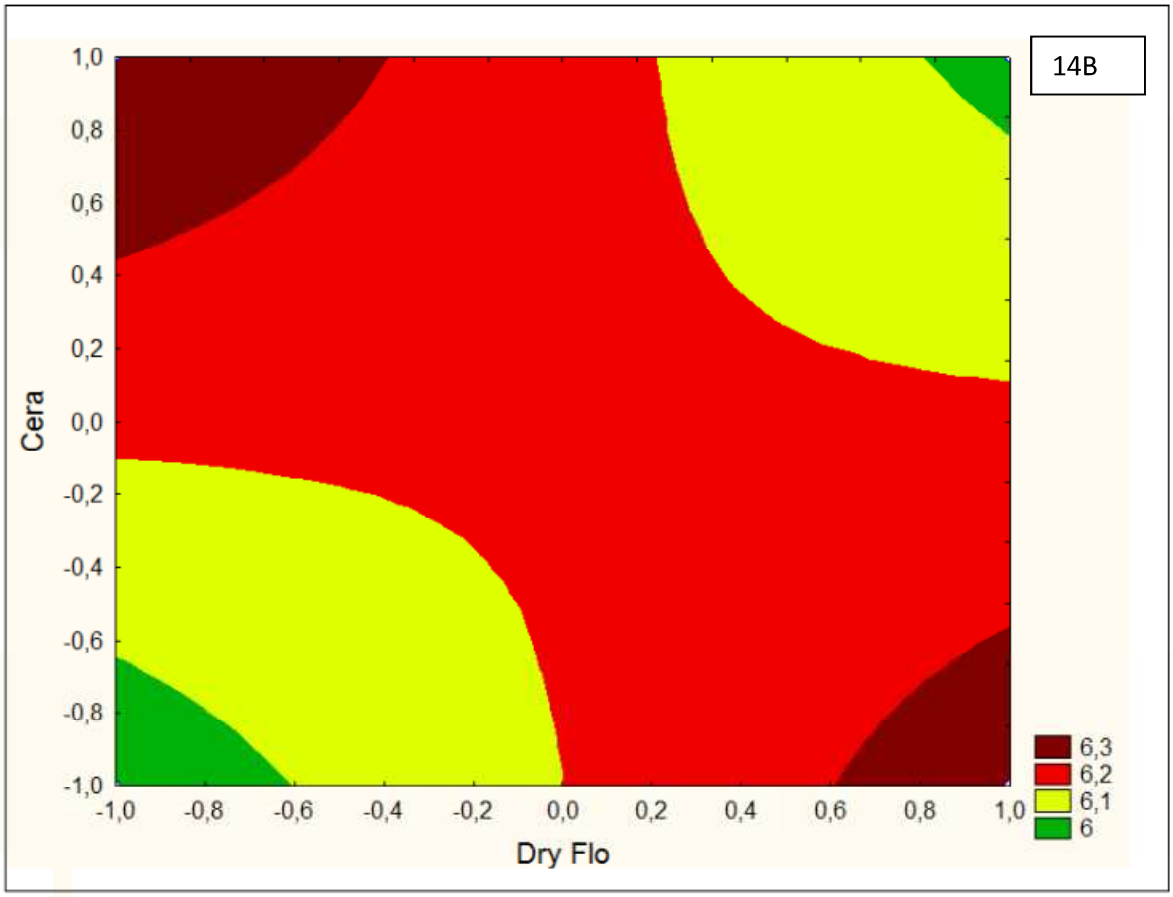


Nos gráficos de superfície de resposta e curva de contorno, respectivamente Figuras 13A e 13B, pode-se verificar a existência de uma região ótima (zona de cor verde) para a resposta pH (otimização da formulação), onde se encontra uma melhor combinação das interações entre Cera e Cocoate BG®, obtendo assim as melhores formulações.

Do mesmo modo, a Figura 14 (14A e 14B) apresenta os efeitos da interação entre o Dry Flo® e a Cera, observando que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram o Dry Flo® na menor concentração (nível -1) e cera Emulium 22® (nível -1), correspondendo às formulações F1 e F5.

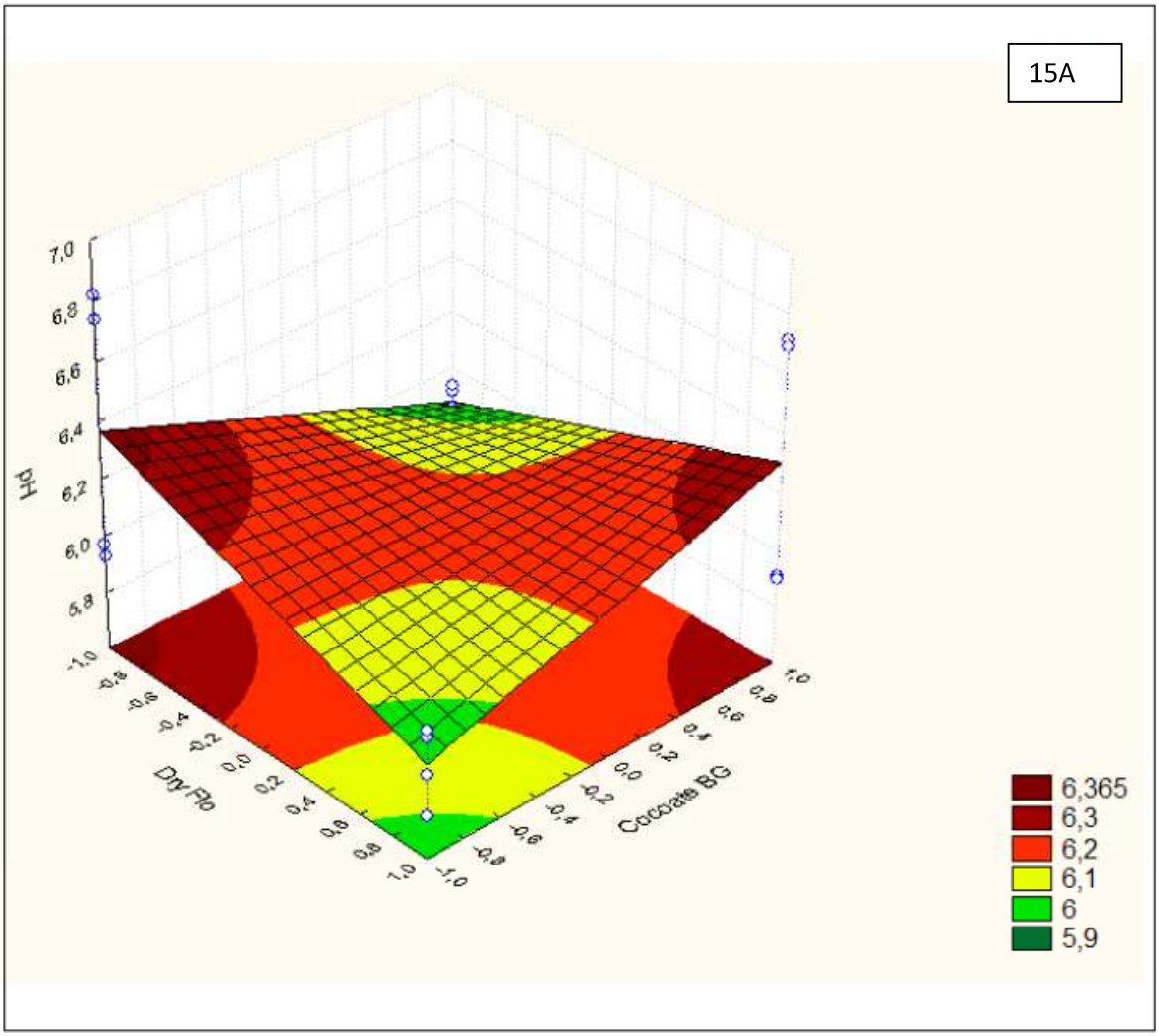
Figura 14 - Efeitos da cera e Dry Flo® no pH

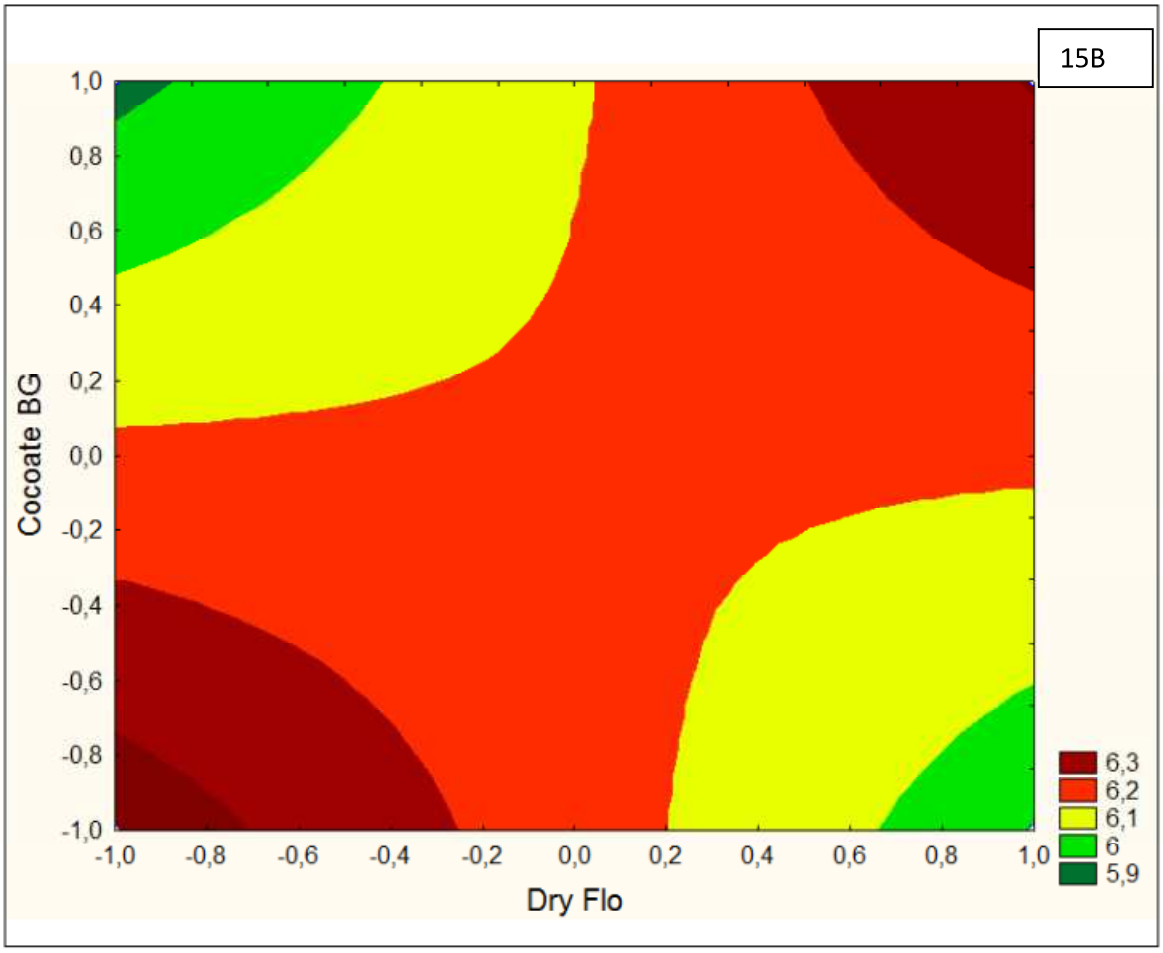




A Figura 15 (15A e 15B) apresenta os efeitos da interação entre Cocoate BG® e Dry Flo® sobre a resposta pH. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram o Dry Flo® na maior concentração (nível +1) e Cocoate BG® na menor concentração (nível -1). Estes resultados correspondem às formulações F2 e F4.

Figura 15 - Efeitos do Cocoate BG® e Dry Flo® no pH





O planejamento fatorial avalia a influência das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes otimizando assim o desenvolvimento das formulações, somado à metodologia de superfície de respostas, determina as condições ótimas (ou níveis ótimos) dos fatores de controle que maximizam a resposta de um sistema. As melhores formulações para a resposta pH foram obtidas com a cera Emulium 22®, na menor concentração de Cocoate BG® independente da concentração de Dry Flo®. Estas formulações foram: F1, F2, F4 e F5. As formulações F3, F6, F7 e F8 foram descartadas segundo o critério pH, pois em suas formulações não se encontram uma melhor combinação das interações entre as variáveis, embora estejam dentro da faixa aceitável para este tipo de formulação.

4.2.2.2 Variável resposta condutividade

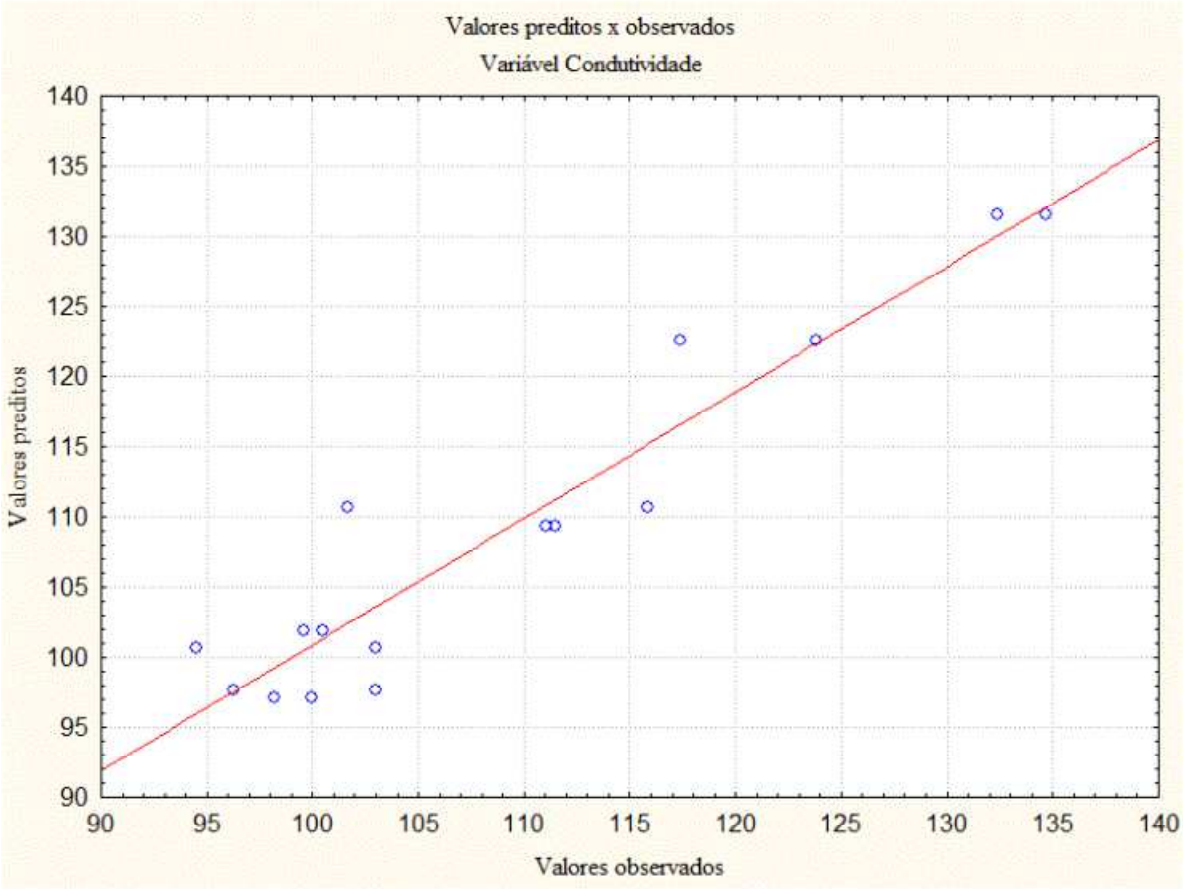
Na Tabela 10 são demonstrados os resultados da ANOVA para a variável resposta condutividade. Verificou-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,89. A análise estatística mostrou que o valor $F_{calculado}$ (13,40) foi maior do que o valor do $F_{tabelado}$ (3,37), sendo os resultados significativos para o nível de confiança de 95%.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta condutividade no T0

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2167,704	6	361,284	13,40
Resíduo (erro)	242,517	9	26,9463	
Falta de ajuste	58,944	1	58,944	2,56
Erro puro	183,573	8	22,9466	
Total	2410,221	15		
R^2	0,899			
$F_{tabelado\ (6;9)}$ = 3,37		$F_{tabelado\ (1;8)}$= 5,32		
F calculado ≥ F tabelado O modelo é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.		F calculado < F tabelado (falta de ajuste) Não há falta de ajuste		

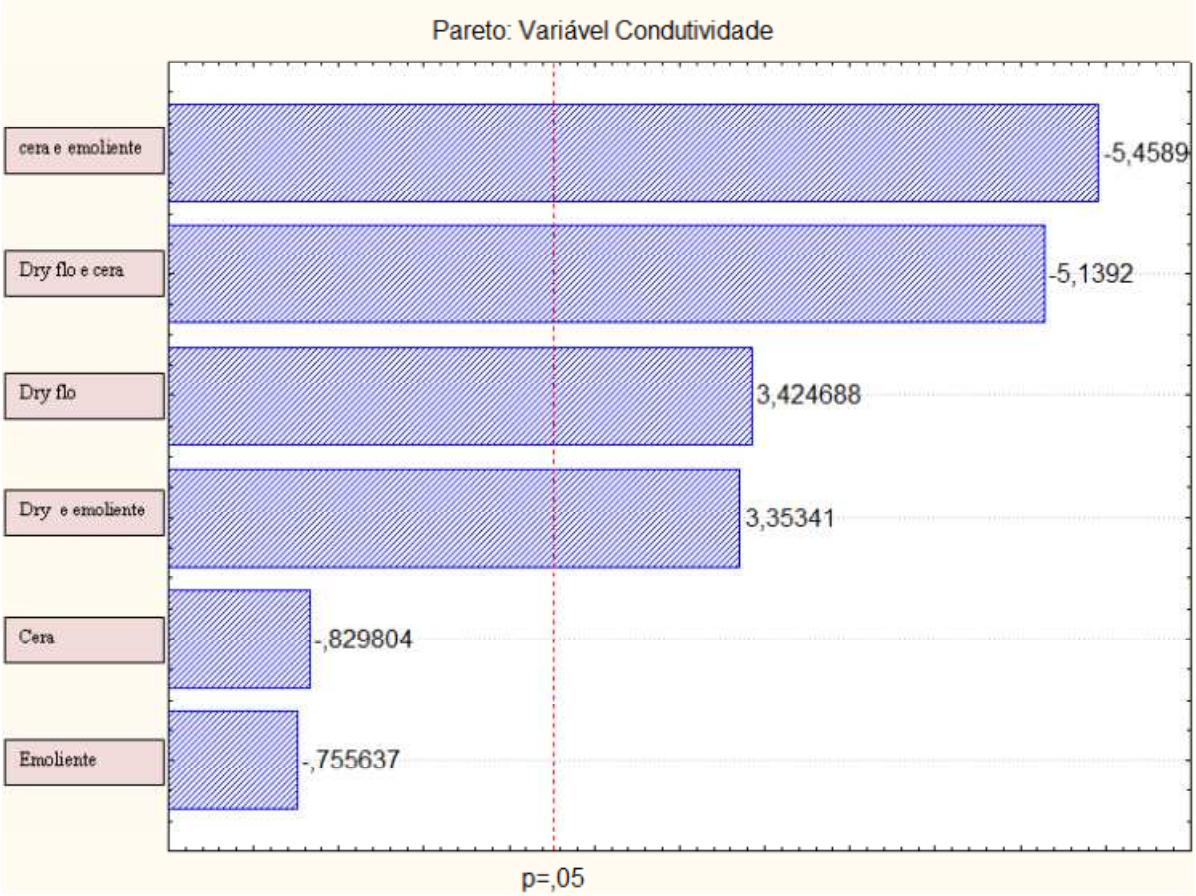
Desse modo o modelo pode ser utilizado de forma preditiva conforme observado na Figura 16, que apresenta grande correlação dos valores preditos e observados.

Figura 16 - Valores preditos e observados para variável condutividade



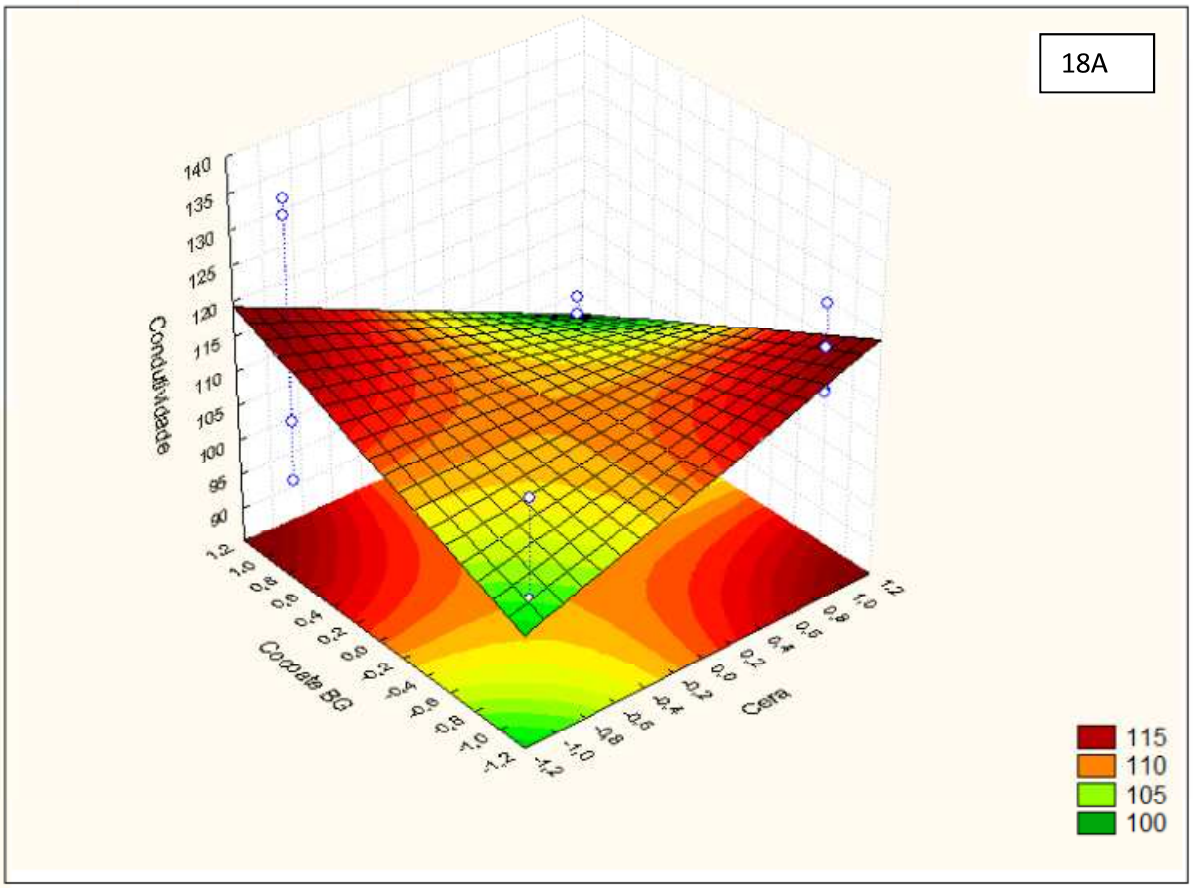
Os valores médios se encontraram na faixa de 98,77 a 133,54 $\mu S/cm^2$. Como a medida da condutividade depende do tipo de emulsão escolhida, bem como da proporção água-óleo existente, consideramos os menores valores como os escolhidos para fins deste estudo. Pelo gráfico de Pareto (Figura 17), observou-se que individualmente apenas a variável Dry Flo® influenciou na resposta condutividade, bem como as interações, tais como Cera e Cocoate BG®, Dry Flo® e Cera, Dry Flo® e Cocoate BG®, as quais foram importantes para a obtenção das melhores formulações. As interações Cera e Cocoate BG®, Dry Flo® e Cera, apresentaram valores negativos, então as melhores formulações para a variável condutividade foram obtidas para os menores valores de Cocoate BG® (nível -1) e a Cera Emulium 22® (nível -1), fato que se repete com Dry Flo® (nível -1) e Cera Emulium 22® (nível -1). Já a interação Dry Flo® e Cocoate BG®, que apresentou valor positivo, mostra que a melhor formulação é a que possui a menor concentração de Dry Flo® (nível -1) e maior concentração de Cocoate BG® (nível +1).

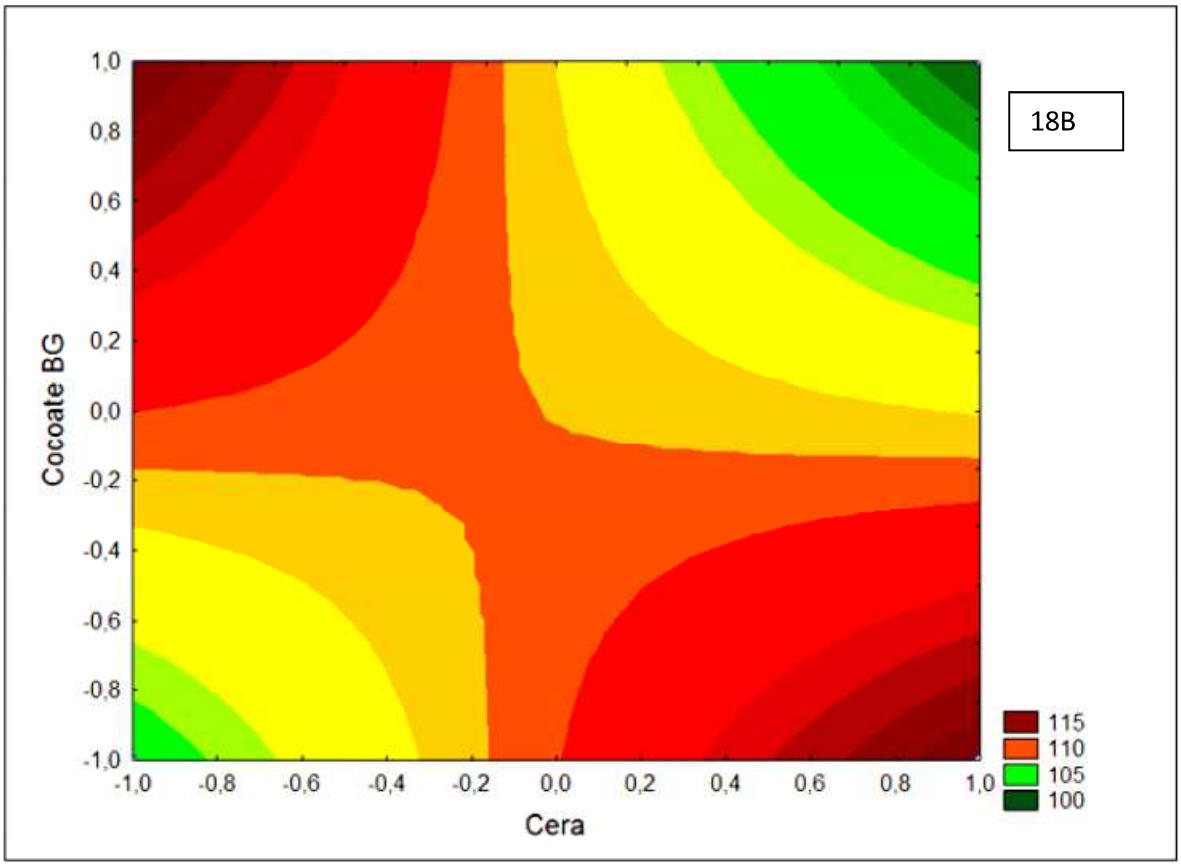
Figura 17 - Gráfico de Pareto para variável condutividade



A Figura 18 (18A e 18B) apresenta os efeitos da interação entre Cocoate BG® e a Cera sobre a resposta condutividade. Os valores médios se encontraram na faixa de 98,77 a 133,54 $\mu S/cm^2$. Esses resultados demonstram a natureza da emulsão como O/A (MASMOUDI et al., 2005). Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram a cera Emulium 22® (nível -1) e a menor concentração de Cocoate BG® (nível -1), correspondendo às formulações F1 e F2.

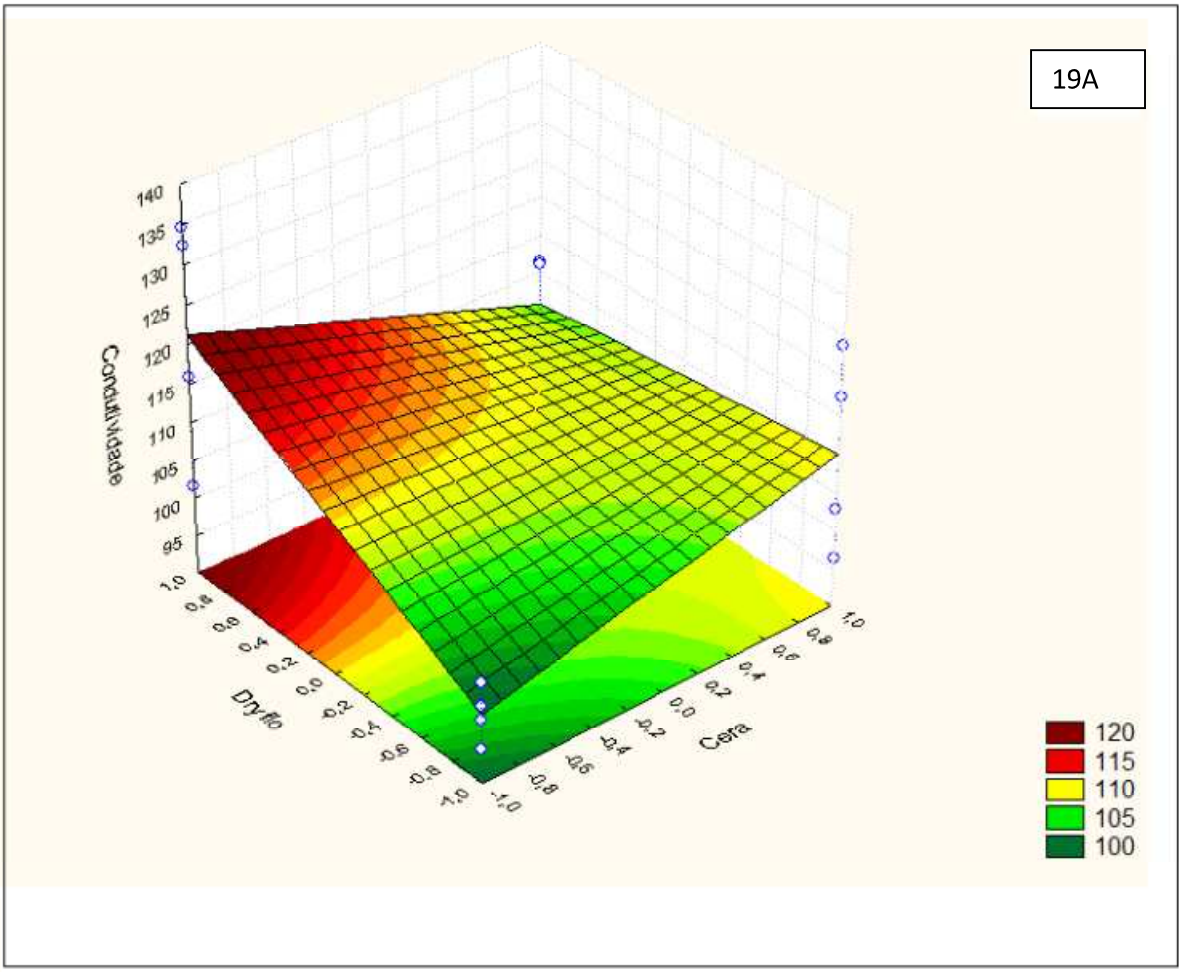
Figura 18 - Efeitos da Cera e Cocoate BG® na condutividade

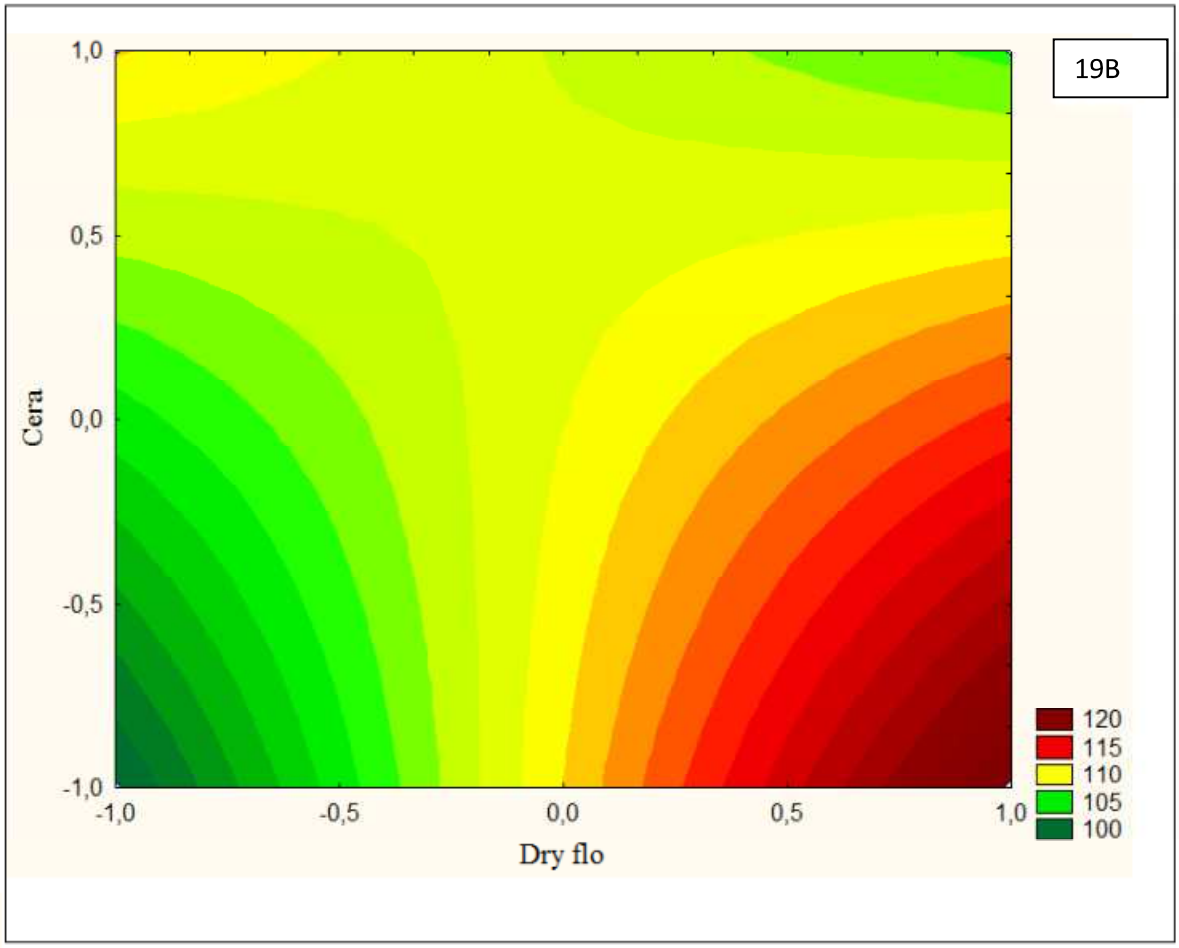




Do mesmo modo, a Figura 19 (19A e 19B) apresenta os efeitos da interação entre o Dry Flo e Cera, observando que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram o Dry Flo na menor concentração (nível -1) e cera Emulium (nível -1), correspondendo às formulações F1 e F5.

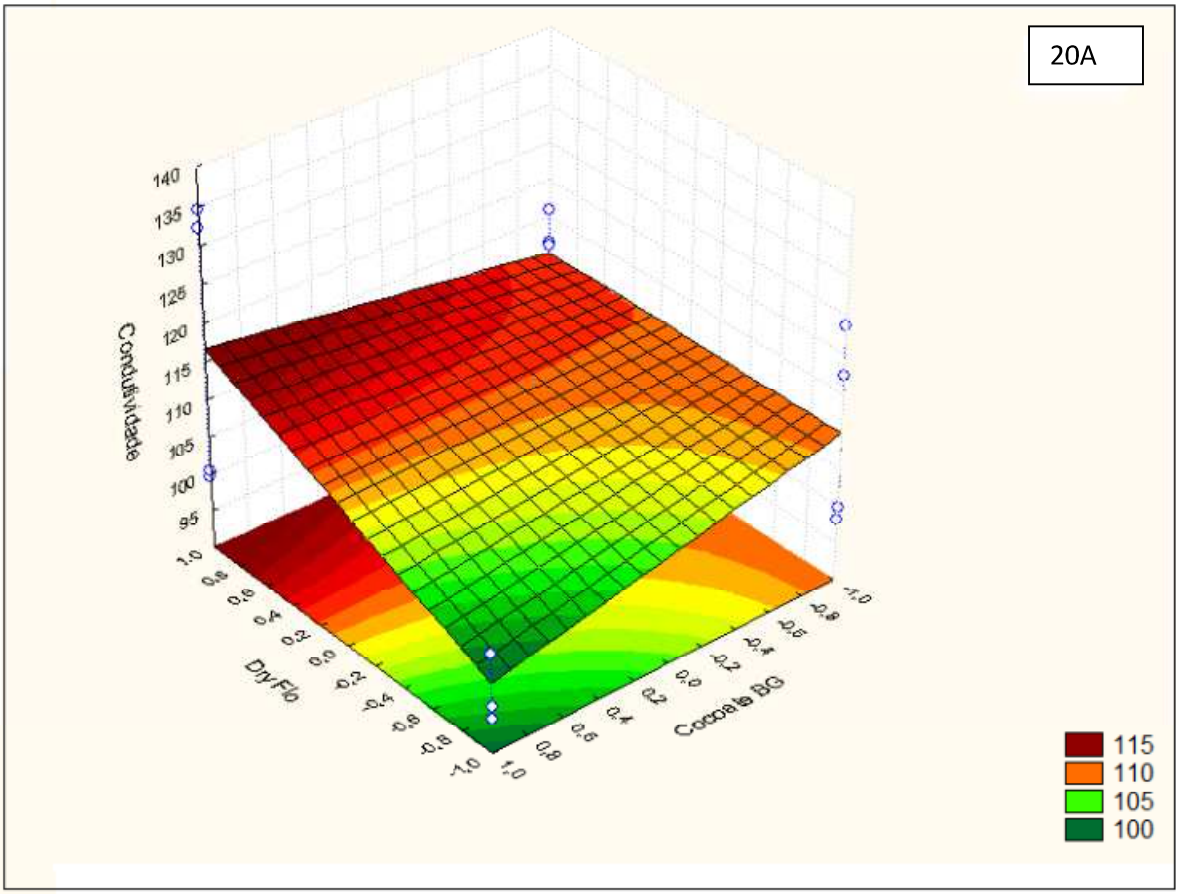
Figura 19- Efeitos da Cera e Dry Flo na condutividade

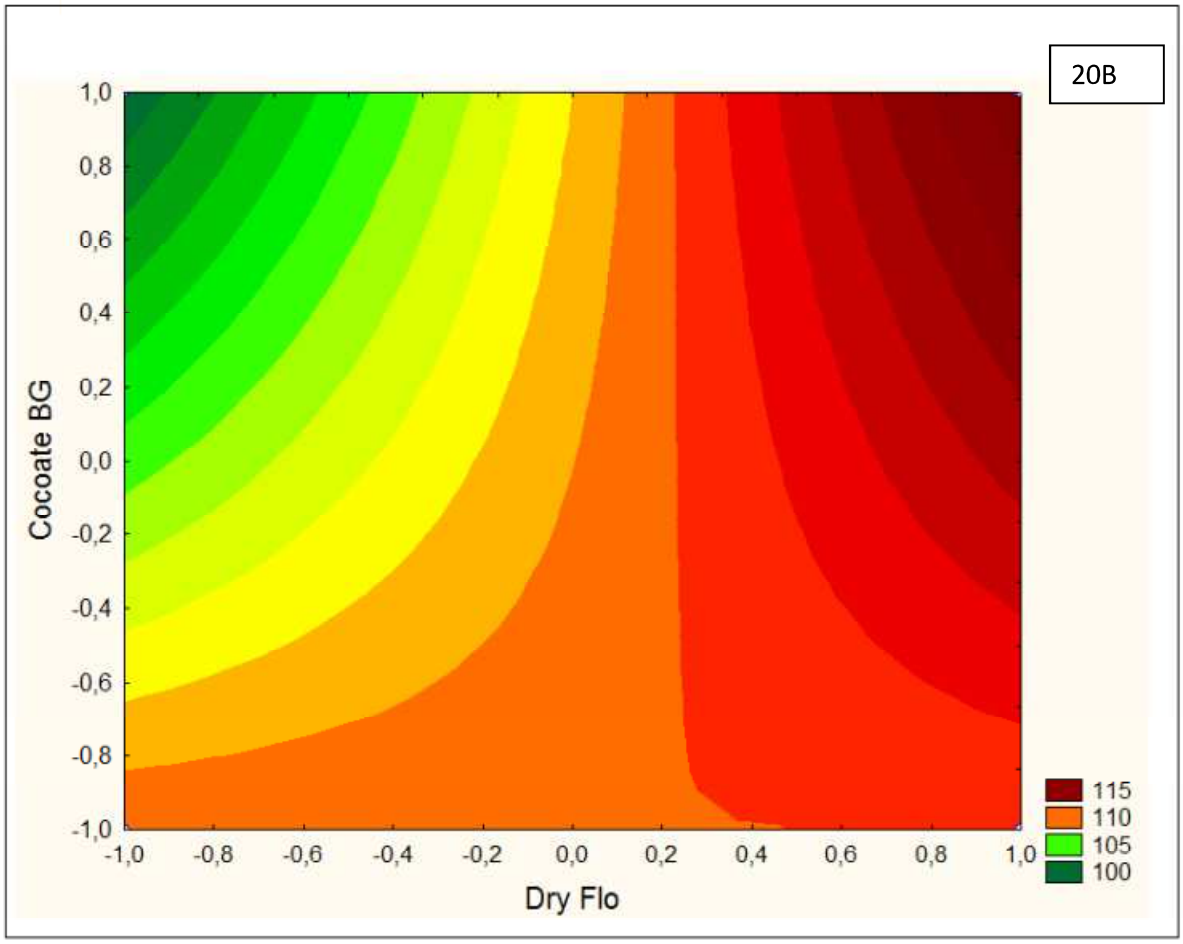




A Figura 20 (20A e 20B) apresenta os efeitos da interação entre Dry Flo® e Cocoate BG® sobre a variável resposta condutividade. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram o Dry Flo® na menor concentração (nível -1) e Cocoate BG® na maior concentração (nível +1). Estes resultados correspondem às formulações F5 e F7.

Figura 20 - Efeitos do Dry Flo e Cocoate BG® na condutividade





Para a resposta condutividade, as melhores formulações foram obtidas com a cera Emulium 22®, na menor concentração de Dry Flo® independente da concentração de Cocoate BG®. As formulações foram: F1, F2, F5 e F7. As formulações F3, F6 e F8 foram descartadas segundo o critério condutividade.

4.2.2.3 Variável resposta FPS

Os resultados da ANOVA para a variável resposta FPS estão descritos na Tabela 11, onde se observa que o coeficiente de correlação e a porcentagem de variância explicada não foram satisfatórios, com um coeficiente de correlação de 0,51. Observa-se também que o valor de $F_{calculado}$ (1,58) é menor que o valor de $F_{tabelado}$ (3,37) a um nível de confiança de 95%. Desse modo, pode-se afirmar que o referido modelo não apresentou significância estatística e que o mesmo não pode ser utilizado para fins preditivos, bem como não serão construídas superfícies de resposta para variável FPS.

Não ter ocorrido diferença significativa para a variável FPS era um resultado esperado, pois a quantidade de filtros solares foi a mesma nas formulações e nenhuma variável interferiu no resultado do FPS. Os valores médios se encontraram na faixa de 26 a 30, atendendo objetivo do trabalho de obter um fotoprotetor de média proteção (15 – 30).

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta FPS no T0

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	61,875	6	10,3125	1,5833
Resíduo (erro)	58,6181	9	6,5131	
Falta de ajuste	0,0069	1	0,0069	9,4181
Erro puro	58,6111	8	7,3263	
Total	120,4931	15		
R^2	0,5135			
$F_{tabelado\ (6;9)}$ = 3,37				
F calculado < F tabelado. O modelo não é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.				

4.2.2.4 Variável resposta tamanho de gotícula

Os resultados da ANOVA para o tamanho de gotícula estão descritos na Tabela 12, onde se observa que o coeficiente de correlação e a porcentagem de variância explicada também não foram satisfatórios, com um coeficiente de correlação de 0,19. Observa-se também que o valor de $F_{calculado}$ (1,84) é menor que o valor de $F_{tabelado}$ (3,37) a um nível de confiança de 95%. Desse modo, pode-se afirmar que o referido modelo não apresentou significância estatística e que o mesmo não pode ser utilizado para fins preditivos, bem como não serão construídas superfícies de resposta para a variável tamanho de gotícula. Esse resultado mostra que as amostras apresentaram homogeneidade no tamanho de gotícula.

Segundo Ferreira (2008), emulsões com tamanho de gotícula uniforme possuem melhor estabilidade, além da reprodutibilidade do processo de obtenção. Além disso, como já afirmado pelo mesmo pesquisador anteriormente, é desejável que uma boa emulsão apresente tamanho de gotícula pequeno, entre 0,1 e 10 µm; no presente estudo, as amostra apresentaram valores na faixa entre 1,08 e 1,20 µm, mostrando assim valores desejáveis, indício de boa estabilidade e reprodutibilidade.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta tamanho de gotícula no T0

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,0615	6	0,0102	1,84
Resíduo (erro)	0,0497	9	$5,52 \times 10^{-3}$	
Falta de ajuste	0,0162	1	0,0162	3,88
Erro puro	0,0334	8	$4,175 \times 10^{-3}$	
Total	0,0615	15		
R^2	0,1919			
$F_{tabelado\ (6;9)} = 3,37$		$F_{tabelado\ (1;8)} = 5,32$		
F calculado < F tabelado. O modelo não é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.		F calculado < F tabelado (falta de ajuste) Não há falta de ajuste		

4.2.2.5 Variável resposta espalhabilidade

Os resultados da ANOVA para a variável resposta espalhabilidade estão descritos na Tabela 13, onde se observa que o coeficiente de correlação e a porcentagem de variância explicada não foram satisfatórios, com um coeficiente de correlação de 0,38. Observa-se também que o valor de $F_{calculado}$ (0,92) é menor que o de $F_{tabelado}$ (3,37) a um nível de confiança de 95%. Desse modo, pode-se afirmar que o referido modelo não apresentou significância estatística, sendo então uma variável robusta podendo ser utilizadas concentrações menores dos componentes com mesmo resultado. Pode-se dizer ainda que apesar das variações nas concentrações dos componentes e tipo de cera, a espalhabilidade se manteve constante garantindo o FPS, se aplicado corretamente. Em Apolinário et al (2013), os pesquisadores concluíram que as concentrações das ceras auto-emulsionantes influenciaram no tamanho de gotícula e espalhabilidade das formulações, estando esse fator relacionado a estabilidade das mesmas. Em nosso estudo, não houve variação na concentração das ceras auto-emulsionantes utilizadas provavelmente por isso não houve influência nestas variáveis.

Nas formulações F7 e F8 ocorreu separação de fases, no teste do fator de espalhabilidade destas formulações observou-se que, ao colocar a placa de vidro sob a amostra, formou-se uma espécie de "rede", com espaços vazios, sem homogeneidade; mesmo assim foi feita a leitura para atender as exigências do método estatístico.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para a variável de resposta espalhabilidade no T0

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,2502	6	0,0417	0,92
Resíduo (erro)	0,4088	9	0,045	
Falta de ajuste	0,000089	1	0,000089	0,00174
Erro puro	0,4087	8	0,051	
Total	0,6590	15		
R^2	0,38			
$F_{tabelado\ (6;9)}$ = 3,37				
F calculado < F tabelado. O modelo não é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.				

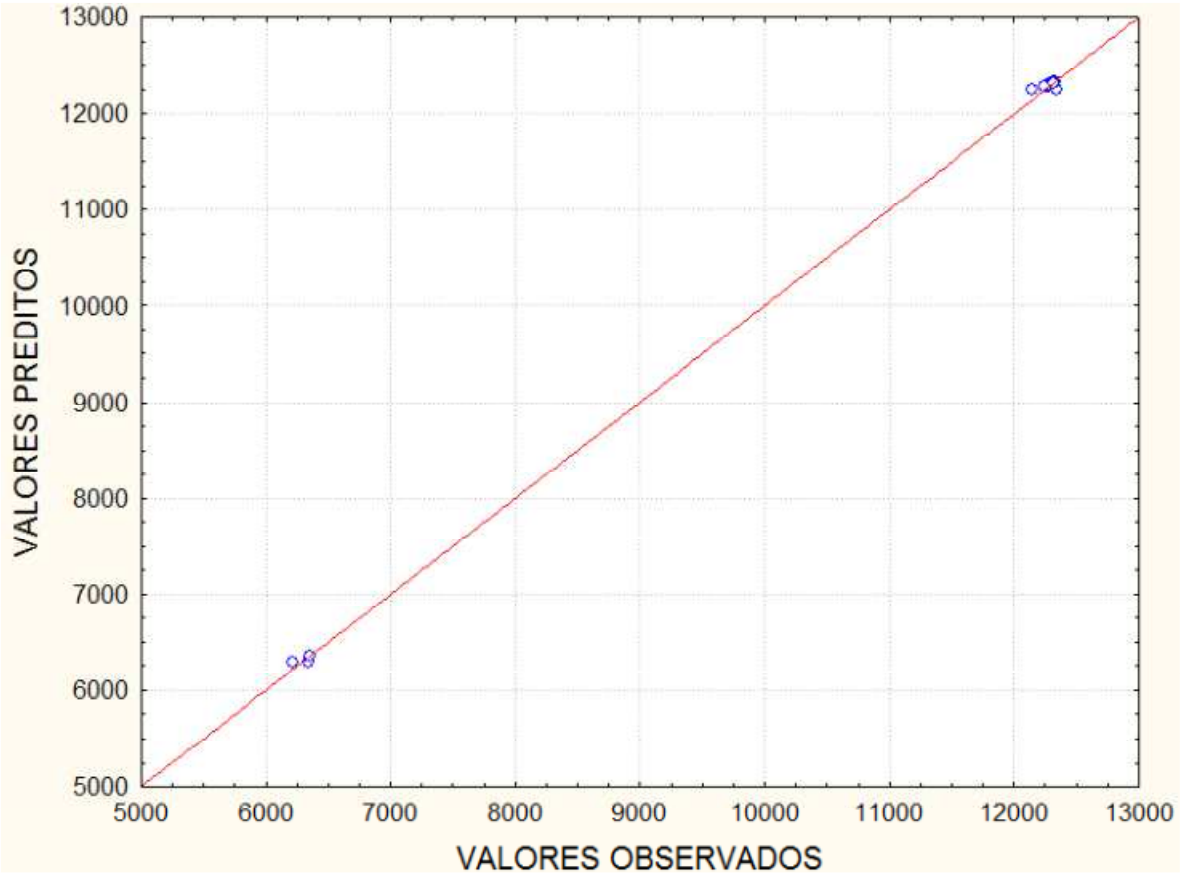
4.2.2.6 Variável resposta viscosidade

Na Tabela 14 são demonstrados os resultados da ANOVA para a variável resposta viscosidade. Verificou-se que o modelo pode ser usado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um coeficiente de correlação de 0,99. A análise estatística mostrou que o valor $F_{calculado}$ (5,75) foi maior do que o valor do $F_{tabelado}$ (3,37), sendo os resultados significativos para o nível de confiança de 95%. Desse modo o modelo pode ser utilizado de forma preditiva conforme observado na Figura 21 que apresenta a correlação dos valores preditos e observados, mostrando grande correlação pela disposição dos pontos ao longo da reta.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta viscosidade no T0

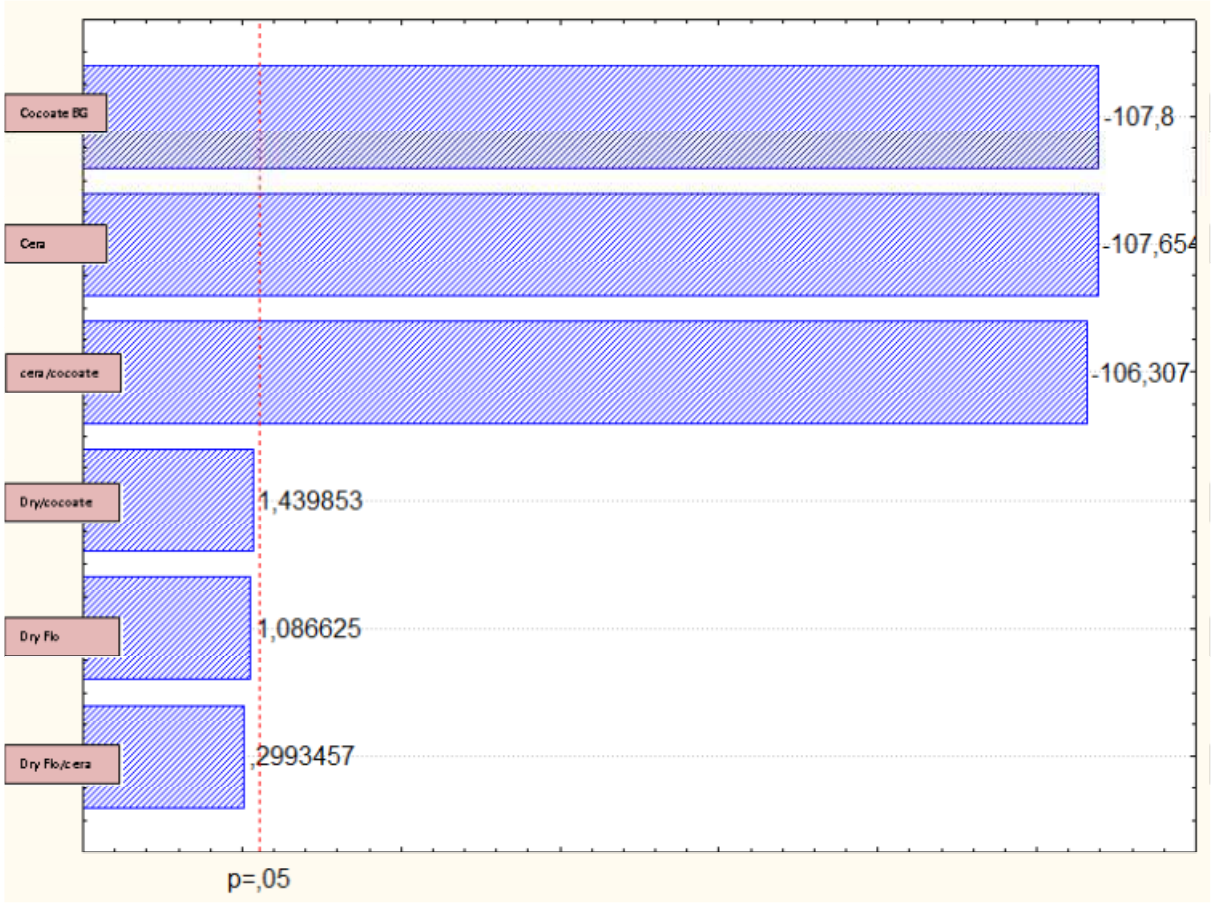
Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	106992	6	17832	5,75
Resíduo (erro)	27899	9	3099,88	
Falta de ajuste	69	1	69	0,019
Erro puro	27830	8	3478,75	
Total	107020894	15		
R^2	0,999			
$F_{tabelado\ (6;9)}$ = 3,37		$F_{tabelado\ (1;8)}$= 5,32		
F calculado ≥ F tabelado. O modelo é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.		F calculado < F tabelado (falta de ajuste) Não há falta de ajuste		

Figura 21 - Valores preditos e observados para variável viscosidade



Pelo gráfico de Pareto (Figura 22) observou-se que individualmente as variáveis Cera e Cocoate BG® influenciaram na resposta viscosidade, bem como a interação Cera e Cocoate BG®. Tanto as variáveis independentes quanto a interação apresentaram valor negativo, então as melhores formulações para a variável viscosidade foram obtidas para a menor concentração de Cocoate BG® (nível -1) e cera Emulium® 22 (nível -1).

Figura 22 - Gráfico de Pareto para variável viscosidade

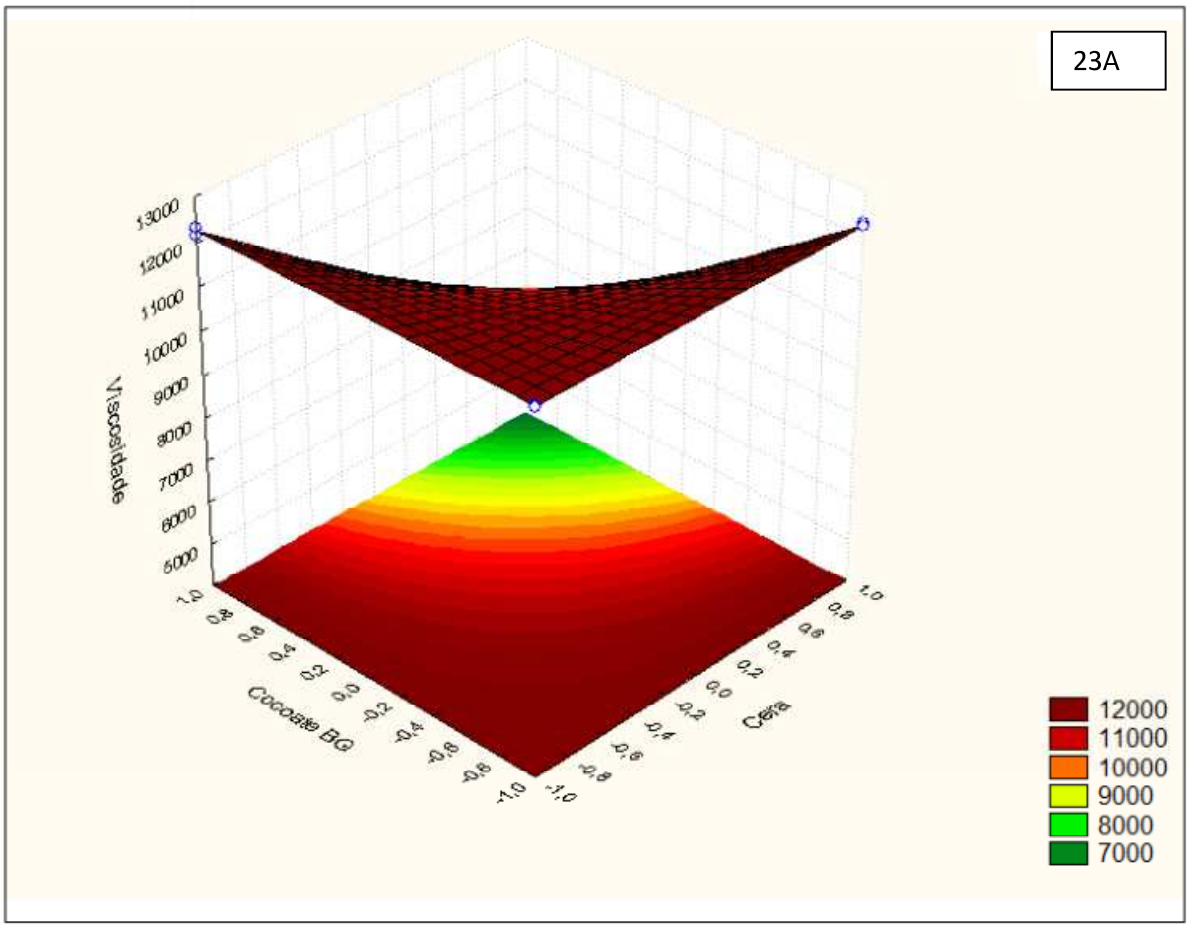


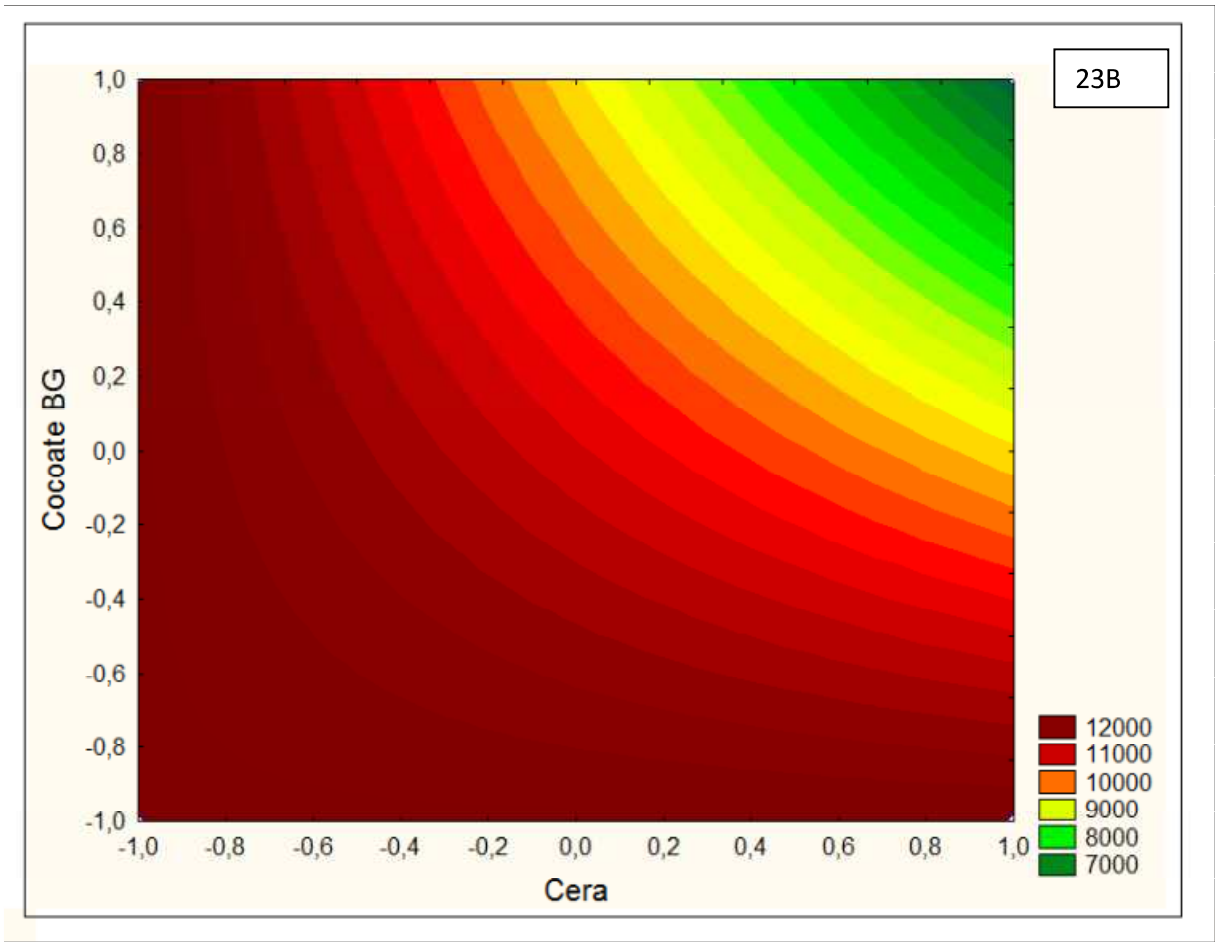
Ao fazer a análise de superfície de resposta e curva de contorno, respectivamente Figuras 23A e 23B, pode-se verificar a existência de uma região ótima (zona de cor vermelha) para a resposta viscosidade (otimização da formulação), onde se encontra uma melhor combinação da interação Cera e Cocoate BG®, obtendo assim as melhores formulações. A mesma figura apresenta os efeitos da interação entre Cera e Cocoate BG® sobre a variável resposta viscosidade. A faixa de valores encontrada foi de 6282 a 12328 cP, tendo sido observados os valores menores somente em F7 e F8.

Tanto a viscosidade quanto a espalhabilidade são determinantes na característica sensorial do produto final, não existindo uma faixa ideal de valores. Nesse caso, é de grande importância a experiência do formulador no sentido de adequar o produto à necessidade do consumidor.

Observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas formulações que utilizaram a Cera no menor nível (nível -1) e Cocoate BG® na menor concentração (nível -1). Estes resultados correspondem às formulações F1 e F2.

Figura 23 - Efeitos da cera e Cocoate BG® na viscosidade





As variáveis que influenciaram a otimização da formulação foram pH, condutividade e viscosidade, sendo que a ANOVA mostrou uma forte correlação, o que garante um ajuste do modelo com os dados experimentais. Já as variáveis que não influenciaram foram tamanho de gotícula, espalhabilidade e FPS.

Os resultados mostraram que as formulações escolhidas na variável pH foram F1, F2, F4 e F5; na variável condutividade foram F1, F2, F5 e F7 e na variável viscosidade foram F1 e F2. Esses resultados mostraram que as formulações comuns às três variáveis foram F1, F2 e F5, indicando dessa forma que a ferramenta estatística planejamento fatorial foi satisfatória no desenvolvimento do experimento.

Observou-se que nas formulações escolhidas há uma constância da cera Emulium 22®, não tendo ocorrido influência das concentrações de Dry Flo® e Cocoate BG®. É possível que tenha havido interações entre os componentes que justifiquem esses resultados, para analisar estas interações seriam necessárias metodologias analíticas adequadas, mas não foi a proposta desse estudo.

Os resultados demonstraram que a condutividade foi influenciada pelo tipo de cera, conforme observado também por Apolinário (2013), sendo os melhores resultados obtidos com a cera Emulium® 22.

Smaoui et al (2013) avaliaram a estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo os filtros solares benzofenona-3, etil metoxicinamato e dióxido de titânio em diferentes porcentagens. Os autores observaram que a formulação com 7% de benzofenona-3, 7% etilhexil metoxicinamato e 6% de dióxido de titânio apresentou maior estabilidade físico-química e microbiológica. Em nosso estudo, não houve variação das concentrações dos filtros solares nas formulações, e a variável FPS não influenciou na estabilidade das mesmas, apesar de ter sido utilizado dois tipos de ceras.

Tendo em vista que o planejamento fatorial é uma ferramenta de tomada de decisões que visa a escolha racional de processos e produtos, foram selecionadas as formulações F1, F2 e F5 para prosseguir no estudo de estabilidade, o qual será visto em detalhes.

5 Estudos de Estabilidade das Formulações Fotoprotetoras

5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS

5.1 Metodologia

5.1.1 Estabilidade Preliminar

A estabilidade preliminar está inserida no guia de estabilidade da Anvisa (BRASIL, 2004), sendo esse um norteador para os estudos de estabilidade de cosméticos. Os testes utilizados para avaliar a estabilidade preliminar são a centrifugação e o ciclo gelo/degelo, com tempo de duração entre 12 e 15 dias. Os parâmetros avaliados no presente trabalho foram aspecto e cor, tamanho de gotícula, valor de pH, condutividade, fator de espalhabilidade, viscosidade aparente e FPS.

Segundo o mesmo, o produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nessa etapa o produto pode ser submetido aos testes de estabilidade acelerada, o qual será descrito em detalhes a seguir.

As amostras estudadas nesse capítulo foram F1, F2 e F5, as quais foram selecionadas no capítulo anterior.

5.1.1.1 Centrifugação

Alíquotas de 5g da formulação foram distribuídas em tubos cônicos, centrifugadas a 274,4 rcf por 15 min à temperatura ambiente, com metodologia adaptada de Velasco et al (2008). De acordo com os resultados as formulações foram classificadas seguindo o critério a seguir: (IM) para intensamente modificada; (M) para modificada; (LM) para levemente modificada; (N) para normal, sem alteração quanto ao aspecto.

5.1.1.2 Ciclo Gelo/Degelo

As formulações foram submetidas a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento, sendo adotado um ciclo de 24 horas a 40° C ± 2, seguido de 24 horas a 4° C ± 2 durante 12 dias.

5.1 2. Estabilidade Acelerada

Este teste utiliza as mesmas condições que a estabilidade preliminar e pode ser utilizado para estimar o prazo de validade do produto. Geralmente tem duração de 90 dias

podendo ser estendida dependendo do tipo de produto (BRASIL, 2004). Neste estudo as amostras foram submetidas a aquecimento em estufa, resfriamento em refrigerador, exposição à radiação luminosa e ao ambiente, conforme referência citada; o tempo de avaliação foi de 180 dias.

No presente estudo foram utilizadas as seguintes condições, conforme a Tabela 15.

Tabela 15 - Descrição das condições de armazenamento na estabilidade acelerada

Condições de Armazenamento	Temperatura
Estufa	40±2ºC
Geladeira	5±2ºC
Luz Ultravioleta*	-
Ambiente	25±2ºC

***Experimento realizado em recipiente fechado de madeira**

Foram utilizadas condições que simulassem situações extremas a que as formulações possam ser submetidas, considerando que é um fotoprotetor e que pode estar exposto a oscilações de temperatura e radiação solar, necessitando que o produto permaneça estável.

5.2 Resultados e Discussão da Estabilidade Preliminar

5.2.1 Centrifugação

As formulações F1, F2 e F5 mostraram-se estáveis após o teste de centrifugação, não apresentando alterações e o mesmo ocorrendo com suas réplicas.

Este ensaio preliminar é amplamente utilizado nos estudos de pré-formulação em veículos emulsionados e visa avaliar a ocorrência de separação de fases, o que possibilita identificar as formulações aptas para prosseguir nos testes de caracterização e avaliar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas da formulação (BRASIL, 2004). O teste de centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, coalescência entre outras (BRASIL, 2008).

5.2.2 Ciclo Gelo/Degelo

Após o ciclo gelo/degelo não houve modificação da aparência das formulações F1 e F2, o que se repetiu nas réplicas correspondentes (F9 e F10, respectivamente). Na formulação F5 houve separação de fases, não sendo confirmada por sua réplica (F13), a qual não se modificou, sugerindo um problema na farmacotécnica em F5 (Tabela 16) .

Tabela 16 - Análise macroscópica das formulações submetidas a tempo zero e ciclo gelo/degelo

Formulações	Tempo zero	Gelo/degelo
F1	N	N
F2	N	N
F5	N	LM
F9	N	N
F10	N	N
F13	N	N

Normal (N)/ Levemente modificada (LM)/

Na Tabela 17 podem ser observados os valores médios com desvio padrão de todas as variáveis respostas no T0 e ciclo gelo/degelo das formulações analisadas. Foi aplicado o teste de Tukey ($p<0,05$) para comparar os valores médios.

Na resposta pH e espalhabilidade as médias não diferiram estatisticamente entre si para F1, F2 e F5.

Tabela 17 - Variáveis respostas analisadas no tempo zero(T0) e ciclo gelo/degelo(G/D)

Formulação	pH	Condutividade ($\mu S/cm^2$)	Fator Espalhabilidade (g/mm^2)	FPS	Viscosidade aparente (cP)	Tamanho de Gotícula (µm)
F1 T0	5.95 ± 0.02	99.10 ± 1.23	1.75 ± 0.28	26 ± 0.0	12328± 9.89	1.10 ±0.03
F1 G/D	5.93 ± 0.04	73.07 ± 1.23	1.91 ± 0.16	25.5 ± 0.7	12326±19.0	1.00 ±0.003
F2 T0	5.82 ± 0.01	108.79 ± 10.01	1.79 ± 0.07	26 ± 1,41	12306±1.41	1.078± 0.007
F2 G/D	5.92 ± 0.01	87.29 ± 19.25	1.85 ± 0.20	25,5 ± 0,7	12356±37,47	1.008± 0.035
F5 T0	5.92 ± 0.01	98.77± 5.98	1.62 ± 0.41	27 ± 0.0	12242±135.7	1.099 ± 0.035
F5 G/D	6.29 ± 0.41	75.92± 19.21	1.71 ± 0.22	26.5 ± 0.7	12362±5.65	0.986 ± 0.010

OBS.: Valor médio obtido de 3 determinações, sendo então calculada a média desse valor com sua réplica (n=2).

5.2.3 Estabilidade Acelerada

5.2.3.1 Análise Macroscópica

A análise visual das formulações expostas às condições de armazenamento e no tempo (Anexo A) revelou ausência de coalescência espontânea das fases, floculação ou qualquer sinal de separação de fases nas formulações F1e F2, apresentando cor branca levemente amarelada, odor característico e aspecto homogêneo, bem como em suas réplicas (F9, F10) em todos os tempos e condições de armazenamento. Na formulação F5 ocorreu discreta separação de fases a partir do T60 em estufa, não ocorrendo o mesmo em sua réplica F13, permanecendo normal em todos os tempos e condições de armazenamento.

5.2.3.2 Tamanho de gotícula

O tamanho de gotícula foi avaliado nas formulações escolhidas (F1, F2 e F5) nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados mostraram que as médias não diferiram estatisticamente entre si, considerando os tempos e condições de armazenamento (Anexo B), mostrando que as formulações são estáveis para essa resposta.

5.2.3.3 Determinação do pH

O pH foi avaliado nas formulações escolhidas nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados mostraram que somente as médias de F5 em T90 diferiram estatisticamente entre si, tanto em condição de armazenamento ambiente quanto sob luz ultravioleta. Esse resultado sugere uma instabilidade química, apesar dos valores estarem dentro da faixa aceitável. Ao analisar F5 quanto à sua composição, observou-se que essa possui uma maior concentração de Cocoate BG®, podendo ter ocorrido um processo de rancificação por hidrólise, oxidação ou ambos, não perceptível por suas características organolépticas (Anexo C).

5.2.3.4 Determinação da condutividade

A condutividade foi avaliada nas formulações escolhidas nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados mostraram que as médias não diferiram estatisticamente entre si, considerando os tempos e condições de armazenamento (Anexo D), mostrando que as formulações são estáveis para essa resposta.

5.2.3.5 Avaliação da espalhabilidade

A espalhabilidade foi avaliada nas formulações escolhidas nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados mostraram que as médias não diferiram estatisticamente entre si, considerando os tempos e condições de armazenamento (Anexo E), mostrando que as formulações são estáveis para essa resposta.

5.2.3.6 Avaliação da viscosidade

A viscosidade foi avaliada nas formulações escolhidas nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados revelaram que a viscosidade variou de modo significativo nas formulações F1 e F2, tendo F1 variado em T90 no ambiente e F2 variado em T60, tanto no ambiente quanto na geladeira (Anexo F), não representando modificação aparente nas formulações, mesmo ao final do estudo.

5.2.3.7 Determinação do fator de proteção solar (FPS)

A resposta fator de proteção solar foi avaliada nas formulações escolhidas nos diferentes tempos e condições de armazenamento.

Os resultados evidenciaram que as médias não diferiram estatisticamente entre si, mostrando que as formulações são estáveis para a resposta FPS, tanto para mudanças de temperatura quanto para exposição à luz ultravioleta (Anexo G).

Embora existam muitos estudos sobre FPS em diversas formas farmacêuticas semissólidas, a maioria deles não aborda a questão do comportamento quando as embalagens são expostas ao efeito de altas temperaturas como, por exemplo, dentro de um automóvel ou na beira de uma praia (JUNG; TING; SALOPEK, 2012).

Desse modo, os resultados encontrados nesse trabalho que demonstram a estabilidade das formulações quanto ao seu FPS em condições extremas vem a contribuir para esse conhecimento.

5.2.4 Conclusão da Estabilidade Acelerada

Para avaliar as amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$), sendo as médias dos valores comparados e discutidos a seguir. Para efeito de cálculo foi considerado o T0 como referencial dos demais tempos, onde o valor médio foi obtido a partir das triplicatas, sendo então calculada a média desse valor com sua réplica ($n=2$).

Comparando os valores de F1, F2 e F5 por teste de Tukey foi observada uma diferença significativa entre as médias ($p<0,005$).

A formulação F1 apresentou diferença significativa para viscosidade (T90 - ambiente). A formulação F2 apresentou diferença significativa para viscosidade (T60 - ambiente e geladeira). A formulação F5 apresentou diferença significativa para pH (T90 - ambiente e luz ultravioleta), tendo essas informações confirmado as obtidas no ciclo gelo/degelo (item ***5.2.2***).

Apesar das formulações F1 e F2 apresentarem diferença significativa para viscosidade, as mesmas foram consideradas estáveis nas condições do estudo, pois apresentaram as características sensoriais exigidas pelo consumidor da farmácia magistral. A formulação F5 foi considerada instável.

Será dada continuidade às pesquisas com os testes de segurança exigidos pela Anvisa na formulação F1 em virtude de ter apresentado diferença significativa somente na viscosidade na temperatura ambiente, o que não interfere em sua ação desejada. Além disso possui menor concentração de Cocoate BG ®e Dry Flo®, portanto menor custo.

6 Estudo in vivo da formulação fotoprotetora F1

6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DA FORMULAÇÃO F1

6.1 Metodologia

6.1.1 Avaliação do efeito fotoprotetor da formulação F1 de aplicação tópica após exposição aguda da pele de camundongos à irradiação UVB.

A formulação fotoprotetora F1 foi escolhida para os ensaios *in vivo* a partir dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, sendo chamada então de "formulação" no estudo *in vivo.*

6.1.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos adultos pesando 25-30g. Os animais foram alojados sob temperatura controlada (22 $\pm 1^0$C), ciclo claro/escuro de 12/12h, e receberam ração padrão e água *ad libitum.* Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados à sala experimental por pelo menos 1 hora. O número de animais e o estímulo aplicado foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos. Os experimentos foram realizados com a aprovação do comitê de ética em experimentação animal da Facisa - Faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas em Campina Grande - PB (Protocolo 6420042016).

6.1.1.2 Irradiação UVB

A fonte de irradiação UVB consistiu de uma lâmpada Philips® TL 40W/12 RS que emite um contínuo espectro de luz entre 270-400 nm com pico em 313 nm. Esta lâmpada foi montada em um aparato de madeira desenvolvido para o experimento, que a deixou a 20 cm da superfície (Figura 24) onde os animais foram colocados resultando em uma irradiação de 0,27 mW/cm^2 (CASAGRANDE et al, 2006; VICENTINI et al., 2010; VILELA et al., 2012), medido por um radiômetro IL 1700 (Newburyport, MA, USA) equipado com um sensor UVB. Para a exposição à irradiação (180 minutos), os animais foram colocados individualmente em caixas de polipropileno cobertas com tela (composta de malhas graúdas de filamentos finos de metal) permitindo-lhes livre movimento e exposição das regiões

dorsais à radiação UVB. Uma dose total cumulativa de 2,87 J/ cm^2 de UVB foi aplicada em cada animal (VICENTINI et al., 2010).

Figura 24 – Aparato de madeira com a lâmpada UV

Fonte: Própria autora

6.1.1.3 Grupos e tratamentos

Trinta animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos (n=5) e uma área de aproximadamente 6 cm^2 da superfície dorsal de cada animal foi depilada 24 horas antes da irradiação (BECKLUND, et al., 2010; NG et al., 2013). A aplicação tópica de 0,3 g dos tratamentos (VICENTINI et al., 2010) foi feita 15 minutos antes da irradiação na superfície dorsal dos animais previamente depilados, como a seguir:

Grupo 1: Sem aplicação tópica e não irradiado (NAIVE)

Grupo 2: Aplicação tópica da formulação e não irradiado (FORM)

Grupo 3: Sem aplicação tópica e irradiado (UV)

Grupo 4: Aplicação tópica da base sem filtros solares e irradiado (BASE + UV)

Grupo 5: Aplicação tópica da formulação e irradiado (FORM + UV)

Grupo 6: Aplicação tópica de protetor solar comercial e irradiado (COM + UV)

Vinte e quatro horas após o término da irradiação UV, todos os animais foram sacrificados por inalação de halotano seguida de deslocamento cervical (LU et al., 1999).

6.1.1.4 Avaliação Histológica da pele

Após o sacrifício dos animais, uma amostra da pele depilada da região dorsal ($1cm^2$) foi retirada e fixada em solução de formol a 10%, tamponada à temperatura ambiente por 24hs. Após o período de fixação, as amostras de tecido foram desidratadas em uma sequência de álcoois, diafanizadas e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidas secções de 5µm de espessura em micrótomo rotatório (LEICA® RM2125 RTS), para serem coradas com hematoxilina e eosina (HE) (OUHTIT et al., 2000; VICENTINI et al., 2010). A partir das lâminas foram obtidas imagens digitais com o auxílio de um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital (LEICA ICC 50 HD).

Utilizou-se a espessura da epiderme viável (µm), número de camadas de células nucleadas epidermais, quantidade de células de queimadura solar na epiderme e infiltrados inflamatórios subepidérmico como parâmetros de comparação entre os diferentes grupos de tratamento. Para a quantificação da hiperplasia epidérmica foi contada o número de camadas de células nucleadas da epiderme. A análise de imagem foi feita com o auxílio do programa ImageJ® 1.50i (ABASARI et. al., 2006).

6.1.1.4.1 Medida da espessura epidermal e quantificação de camadas de células nucleadas da epiderme

A partir dos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), foram obtidas 5 imagens (objetiva 40x) da região da epiderme da pele do animal e em cada imagem foram feitas duas medidas da espessura da epiderme e duas medidas do número de camadas de células nucleadas (com auxílio do software ImageJ® 1.50i). As médias obtidas das 10 medidas

de cada parâmetro representam a medida da espessura da epiderme e o número de camadas de células nucleadas da epiderme, de cada animal (ABASARI et. al., 2006).

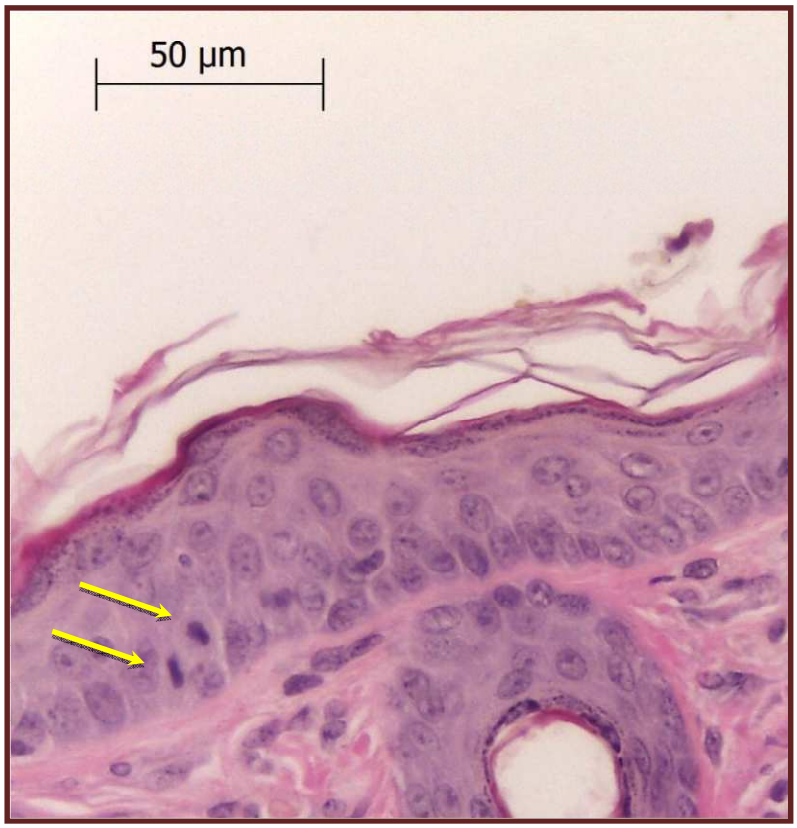
Figura 25 – Medida da Espessura da epiderme (seta amarela) e número de camadas de células nucleadas da epiderme (seta branca) em pele de camundongo, 24hs após a irradiação UV (objetiva 40x).

.

6.1.1.4.2 Contagem de células de queimadura solar

Para contagem de células de queimadura solar, foram utilizadas imagens obtidas com objetiva de 40x dos cortes de pele corados com HE. O número de células de queimadura solar por 100 células da epiderme foi contado em 5 imagens por animal (campo total da imagem). A média obtida das 5 medidas representa o número de células de queimadura solar de cada animal. (VICENTINI et al., 2010; OUHTIT *et al.*,2000; LU Y.P. *et al.*,1999). Tipicamente, as células de queimadura solar estão presentes na epiderme e exibem a característica morfológica de núcleo picnótico contraído e citoplasma róseo (OUHTIT A., et al, 2000).

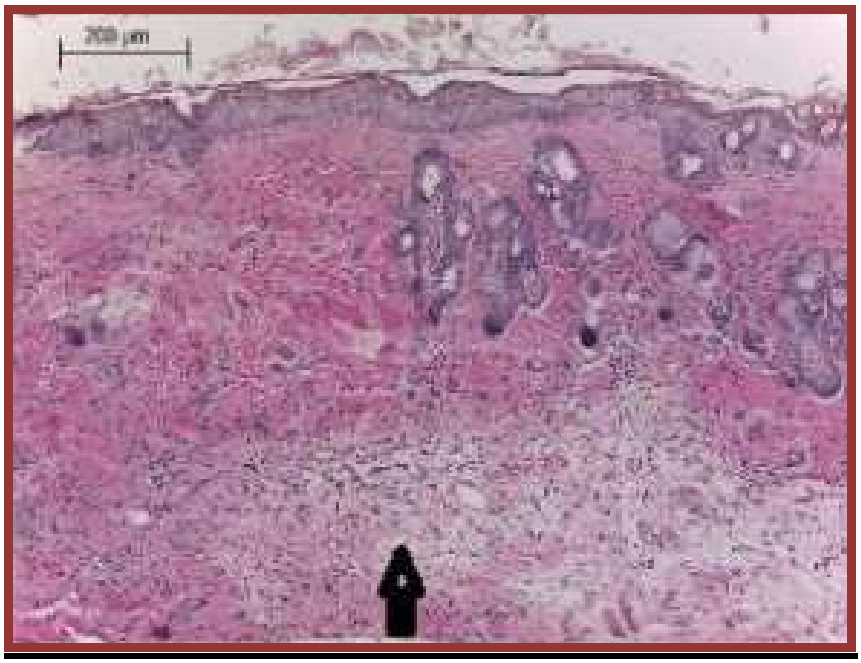
Figura 26 – Células de queimadura solar na epiderme em pele de camundongo 24hs após a irradiação UV. As setas indicam as células de queimadura solar (objetiva 40x).



6.1.1.5 Infiltrados de células inflamatórias

Para avaliação qualitativa dos parâmetros de infiltração de células inflamatórias, foram utilizadas imagens obtidas com objetiva de 40x, cortes de pele corados com hematoxilina e eosina (HE) (RYSER et al, 2014; VICENTINI et al., 2010).

Figura 27 – Infiltrado inflamatório subepidérmico em pele de camundongo 24hs após a irradiação UV (seta preta)



6.1.1.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ± o erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo. As diferenças entre os grupos foram analisadas pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls e consideradas significativas quando $p<0,05$. Para as análises estatísticas e confecções dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism® V. 6.01.

6.2 Resultados e Discussão

6.2.1 Avaliação do efeito fotoprotetor

As alterações histopatológicas da pele de camundongos induzidas por radiação UVB foram avaliadas após exposição de 2,87 J/ cm^2 de irradiação considerando os parâmetros de contagem de camadas de células nucleadas, espessamento da epiderme, presença de células de queimadura solar e infiltração de células inflamatórias.

6.2.2 Quantificação da hiperplasia da epiderme

6.2.2.1 Número de camadas de células nucleadas

Os resultados referentes à análise das camadas de células da epiderme viável, obtidos após 24 horas da aplicação da formulação, seguida da irradiação com dose total cumulativa de 2,87 J/ cm^2 de UVB aplicada em cada animal durante 180 minutos, estão apresentados na Tabela 18 e Figura 28.

Na análise histométrica verificou-se que a irradiação UV provocou um aumento acentuado no número de células nucleadas na epiderme dos animais sem aplicação tópica (grupo UV) e também naqueles que receberam a aplicação tópica da base (Grupo BASE + UV), quando comparados com os animais sem tratamento e sem irradiação (GRUPO NAIVE; $p<0,001$).

A aplicação tópica da formulação impediu o aumento significativo do número de camadas de células nucleadas desencadeado pela radiação UV (GRUPO FORM + UV), quando os dados são comparados com os animais do GRUPO NAIVE, apresentando número de camadas significativamente menor que os animais do GRUPO UV (animais que não receberam a aplicação tópica e foram irradiados), o que pode demonstrar que a formulação protegeu a pele, não permitindo aumento acentuado do número de camadas de células nucleadas da epiderme viável, comparando com a pele que foi agredida com a irradiação UV sem nenhuma proteção. Resultado semelhante foi observado com aplicação tópica do filtro solar comercial (COM + UV). Com relação a este último grupo (COM + UV) observa-se que não houve diferença significativa no resultado com relação ao número de camadas nucleadas na epiderme em comparação com o grupo que recebeu a formulação e foi irradiado (GRUPO FORM + UV). Estudo realizado por DAL'BELO e colaboradores (2008) apresentou resultado semelhante, após 24hs de exposição à radiação UV. Utilizando doses de UVB de 215,46mJ/cm^2, obteve-se média de 2,9±0,6 camadas de células na epiderme para os animais que receberam a formulação tópica e foram irradiados, sendo o resultado estatisticamente significativo com relação ao grupo de animais irradiados e sem formulação tópica (4,17±0,5 camadas de células epidermais).

Somente a aplicação tópica da formulação sem a irradiação (GRUPO FORM) não foi capaz de aumentar significativamente o número de camadas de células nucleadas da epiderme em comparação aos animais sem tratamento e não irradiados (GRUPO NAIVE; $p<0,05$). A

aplicação tópica da formulação sem a agressão da radiação UV não foi capaz de aumentar o número de camadas de células nucleadas da epiderme.

O número médio de camadas de células nucleadas encontradas nos animais sem tratamento e irradiados (GRUPO UV) foi de 4.00±0,6 camadas; resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por El-AlbasariL e colaboradores (2006) após 24 h de exposição de camundongos à radiação UV utilizando dose de UVB de 5kJ/m^2 (4,17±0,5 camadas de células epidermais).

A aplicação tópica da base (GRUPO BASE + UV) teve comportamento semelhante aos animais sem tratamento tópico (GRUPO UV; $p<0,05$) com relação ao número de camadas de células nucleadas da epiderme desencadeado pela radiação UV, média de 4,00±1,1 e 4,00±0,6 camadas, respectivamente. Apesar da base utilizada ser rica em componentes hídricos e emolientes, não possui filtros solares reforçando a importância destes ativos nas formulações fotoprotetoras, reduzindo a agressão causada pela radiação solar. Resultado semelhante foi descrito por Dal'Belo e colaboradores (2008) após 24h de exposição à radiação UV. Utilizando doses de UVB de 215,46mJ/cm^2, obteve resultado de 4,00±0,56 camadas de células nucleadas da epiderme para o grupo irradiado que aplicou a base e 4,17±0,5 camadas de células para o grupo que recebeu apenas a irradiação sem aplicação da base.

Portanto na análise histométrica verificou-se um aumento significativo do número de camadas de células nucleadas da epiderme viável ($p<0,01$) nos grupos irradiados (UV, BASE + UV), em relação aos grupos não irradiados (NAIVE E FORM), demonstrando que a radiação UV provocou uma hiperplasia da epiderme para reposição de células danificadas.

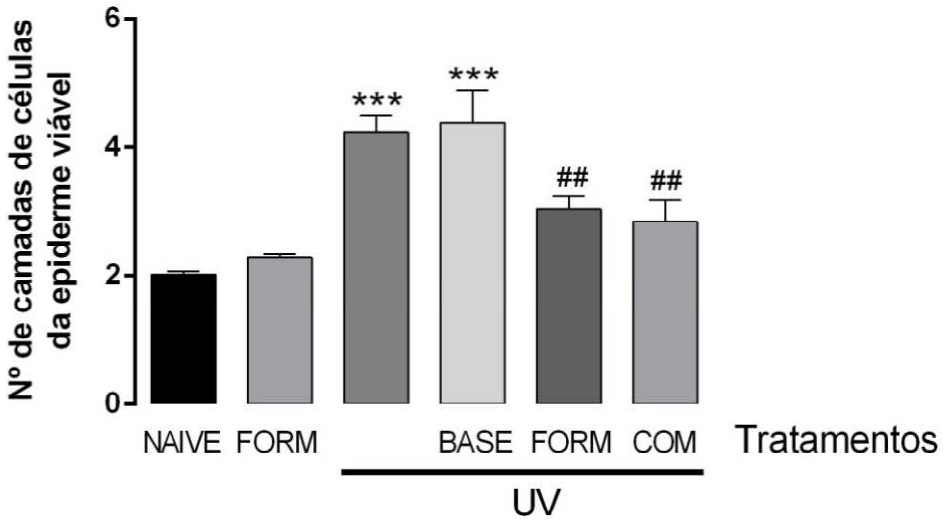
A formulação objeto de estudo (FORM + UV) protegeu a pele contra a hiperplasia da epiderme viável, o que foi evidenciado na redução do impacto no número de camadas da epiderme quando comparada com o grupo irradiado e sem aplicação tópica da formulação (GRUPO UV; $p<0,01$).

Tabela 18 – Espessura da epiderme e número de camadas de células nucleadas em dorso de camundongos após exposição UVB de 2,87J/cm^2 em animais tratados e não tratados

Grupos	N° de camadas nucleadas	Espessura (µm)
Grupo 1 - Sem aplicação tópica e não irradiado (NAIVE)	2,00±0,1	17,68±3,48
Grupo 2 – Aplicação tópica e não irradiado (FORM)	2,00±0,1	25,5±2,9
Grupo 3 - Sem aplicação tópica e irradiado (UV)	4,00±0,6	41,06±8,7
Grupo 4 – Aplicação tópica da base sem filtros solares e irradiado (BASE + UV)	4,00±1,1	41,38±13,2
Grupo 5 – Aplicação tópica da formulação e irradiado (FORM + UV)	3,00±0,5	29,92±4,2
Grupo 6 – Aplicação tópica Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado (COM)	3,00±0,8	31,01±8,03

OBS: Valor médio obtido de 5 animais por grupo. O valor de cada animal representa a média dos valores de 5 imagens analisadas.

Figura 28 – Número de camadas de células da epiderme viável



Legenda:

NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica da formulação e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE + UV: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica da formulação e irradiado; COM + UV: Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado. As barras indicam a média ± EPM de 5 animais por grupo.***$p<0,001$ diferente do grupo NAIVE e do grupo FORM; ## $p<0,01$ diferente do grupo BASE e do grupo UV (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls).

6.2.2.2 Espessura da Epiderme

Os resultados referentes à medida da espessura da epiderme viável, obtidos após 24 horas da aplicação da formulação, seguida da irradiação com dose total cumulativa de 2,87 J/ cm^2 de UVB aplicada em cada animal, estão apresentados na tabela 18 e na Figura 29.

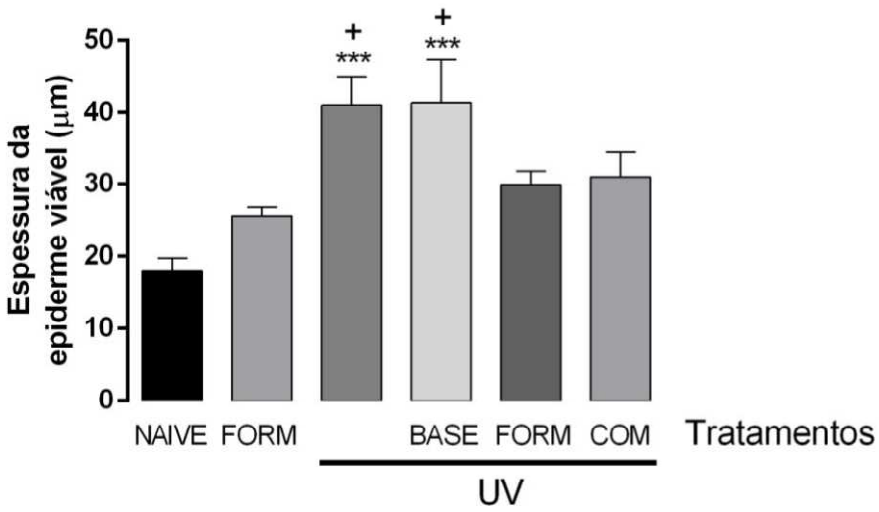
Na análise histométrica verificou-se que a irradiação UV provocou um aumento na espessura da epiderme viável nos animais sem aplicação tópica (grupo UV) e também naqueles que receberam a aplicação tópica da base (Grupo BASE + UV), quando comparados com os animais sem aplicação tópica e sem irradiação (GRUPO NAIVE; $p<0,001$).

A aplicação tópica da formulação impediu o aumento significativo da espessura da epiderme, desencadeado pela radiação UV (GRUPO FORM + UV), quando os dados são comparados com os animais que não receberam a aplicação tópica e não foram irradiados (GRUPO NAIVE). Observa-se nos estudos que ocorre variação do tempo de aparecimento da hiperplasia epidérmica dependendo especialmente da dose de UVB utilizada. Em estudo realizado por EL ABASERI e colaboradores (2006), não houve indução significativa da hiperplasia epidémica em 24hs nos animais irradiados que receberam a formulação, em comparação com o grupo apenas irradiado, ocorrendo uma duplicação da espessura após 48h, sendo a mesma mantida por 72hs (dose de UVB de $5mJ/m^2$). O mesmo ocorreu em estudo realizado por LU e colaboradores (1999); a hiperplasia ocorreu após 72h de irradiação UV, dose de $180mJ/cm^2$, permanecendo até 96 horas.

A espessura média da epiderme encontrada nos animais sem tratamento e irradiados (GRUPO UV) foi de 41,06±8,7µm. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por El-Albasari e colaboradores (2006), após 24 h de exposição de camundongos à radiação UV utilizando dose de UVB de $5kJ/m^2$(40,0±5,1µm).

A espessura média da epiderme encontrada nos animais que não receberam a aplicação tópica e não foram irradiados (GRUPO NAIVE) foi de 17,68±3,48. Resultados semelhantes foram descritos por LU e colaboradores (1999) (16,4±0,02 µm) e Dal'Belo e colaboradores (2008) (19,2±3,3µm), após 24h de exposição à radiação UV utilizando doses de UVB de $180mJ/cm^2$ e $215,46mJ/cm^2$, respectivamente.

Figura 29- Espessura da Epiderme Viável



Legenda:

NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica da formulação e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE + UV: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica da formulação e irradiado; COM + UV: Aplicação tópica de Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado. As barras indicam a média ± EPM de 5 animais por grupo. ***$p<0,001$ diferente do grupo NAIVE; + $p<0,05$ diferente do grupo FORM. Média de 5 campos por animal por grupo (n=5) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls).

6.2.3 Número de Células de Queimadura Solar

Os resultados referentes ao número de células de queimadura solar da epiderme viável obtidos após 24 horas da aplicação da formulação seguida da irradiação com dose total cumulativa de 2,87 J/ cm^2 de UVB aplicada em cada animal estão apresentados na Tabela 19 e na Figura 29.

Na análise do número de células de queimadura solar, verificou-se que a irradiação UV provocou um aumento significativo no número de CQS na epiderme dos animais sem aplicação tópica (grupo UV) e também naqueles que receberam a aplicação tópica da base (Grupo BASE + UV), quando comparados com os animais sem aplicação e sem irradiação (GRUPO NAIVE; $p<0,001$).

A aplicação tópica da formulação impediu o aumento do número de células de queimadura solar desencadeadas pela radiação UV (GRUPO FORM + UV), quando comparadas com os animais sem aplicação e não irradiados (GRUPO NAIVE; $p<0,001$). A formulação aplicada topicamente também impediu o aumento significativo de células de queimadura solar desencadeadas pela radiação UV (GRUPO FORM + UV) quando comparadas com o grupo irradiado sem aplicação (GRUPO UV, $p<0,001$). Apesar da agressão da radiação UV, a formulação testada foi capaz de proteger a pele contra o dano celular. Sabendo-se que o processo de apoptose é uma defesa do organismo frente a agressões sofridas a nível celular e que qualquer distúrbio na regulação deste processo pode provocar a multiplicação de células com DNA danificado levando a possível formação de processos cancerígenos, a proteção com a formulação reduziu o risco ao impedir o aumento de células de queimadura solar (células apoptóticas) apesar da agressão da irradiação. Resultado semelhante foi observado com aplicação tópica do filtro solar comercial (COM + UV).

Neste estudo, os resultados demonstraram que a exposição da pele de camundongos a uma dose única de radiação UVB (2,87 J/ cm^2) sem aplicação tópica (GRUPO UV) resultou na formação de células de queimadura solar (células apoptóticas), após 24hs da irradiação (média de 40.00± 4,7 células por 100 células epidermais). Estes resultados são similares aos encontrados por LU e colaboradores (1999) e por OUHTIT e colaboradores (2000) (média de 59 células por 100 células epidermais) que utilizaram doses de UVB de 1,8 KJ/m^2 e 2,5 KJ/m^2, respectivamente. Os resultados encontrados por DAL'BELO e colaboradores (2008) na dose de UVB de 215,46mJ/cm^2 (média de 57 células por 100 células epidermais), corroboram com o resultado encontrado. Este resultado sugere que o dano ao DNA induzido

pela radiação UVB em animais sem tratamento, foi excessivo e não foi reparado de forma efetiva, levando a ativação de via de morte por apoptose, que elimina as células com danos severos, no entanto, a supressão do processo de apoptose pode ocorrer quando há uma falha no controle do processo de renovação celular levando à mitose de células danificadas. Ainda segundo Ouhtit e colaboradores (2000), que contou o número de células de queimadura solar por 100 células epidermais nos tempos 24h, 48h e 72h após a irradiação, observou-se que no tempo de 24h, obteve-se o pico máximo de CQS para o grupo sem aplicação e irradiado.

O grupo BASE + UV, animais irradiados com aplicação tópica da base, apresentou menor número de CQS que os animais irradiados sem aplicação tópica (GRUPO UV). A base utilizada nos estudos varia sua composição; normalmente contém água como veículo da formulação. A água, na epiderme, distribui-se de acordo com a estrutura histológica que se conhece para este tecido, admitindo-se que as células em diferenciação, desde a camada basal (100% de água) ao estrato córneo (cerca de 10% de água), possuam distintos conteúdos hídricos. A formulação deste estudo possui além da água, ceras, emolientes e ativos formadores de filme que modificam a hidratação da epiderme, o que poderia justificar os menores danos ocorridos na pele em comparação aos animais também irradiados mas que não receberam aplicação tópica. Com relação ao grupo irradiado que recebeu a aplicação da formulação em estudo (FORM + UV), a diferença foi significativa ($p<0,001$) em relação ao GRUPO BASE + UV, mostrando a importância dos filtros solares existentes na formulação.

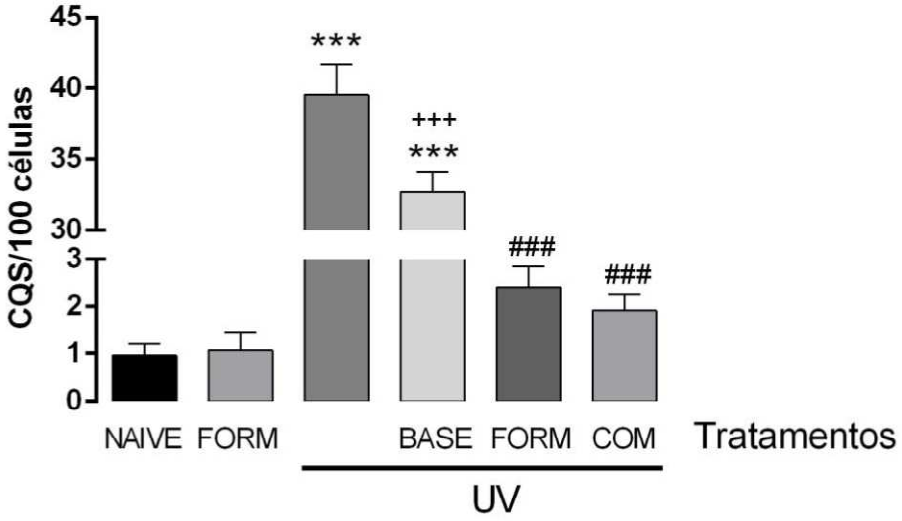
A contagem do número de camadas de células nucleadas e das células de queimadura solar são de grande importância em estudos de eficácia fotoprotetora, uma vez que a exposição à radiação UV causa uma severa hiperplasia da epiderme para reposição das células danificadas, sendo que os processos de apoptose e proliferação celular estão intimamente relacionados (OUHTIT et al., 2000).

Tabela 19 – Número de células de queimadura solar para cada 100 células obtido após 24 hs da irradiação UV de 2,87J/cm^2 em camundongos tratados e não tratados

Grupos	N° de células queimadura solar
Grupo 1 - Sem tratamento e não irradiado (NAIVE)	1,00± 0,95
Grupo 2 – Aplicação tópica da formulação e não irradiado (FORM)	1,00 ± 1,06
Grupo 3 - Sem aplicação tópica e irradiado (UV)	40,00± 4,7
Grupo 4 – Aplicação tópica da base sem filtros solares e irradiado (BASE + UV)	33,00 ± 3,02
Grupo 5 – Aplicação tópica da base e irradiado (FORM + UV)	2,4 ± 0,96
Grupo 6 – Aplicação tópica de Protetor solar comercial FPS 30 e irradiado (COM + UV)	2,00 ± 0,77

OBS: Valor médio obtido de 5 imagens de cada animal sendo 5 animais de cada grupo totalizando 25 determinações por grupo.

Figura 30 - Número de células de queimadura solar (CQS) / 100 células da epiderme viável



Legenda:

NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica da formulação e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE + UV: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica da formulação e irradiado; COM + UV: Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado. As barras indicam a média ± EPM de 5 animais por grupo.***$p<0,001$ diferente do grupo NAIVE e do grupo FORM; ### $p<0,001$ diferente do grupo UV e do grupo BASE + UV; +++ $p<0,001$ diferente do grupo UV (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls).

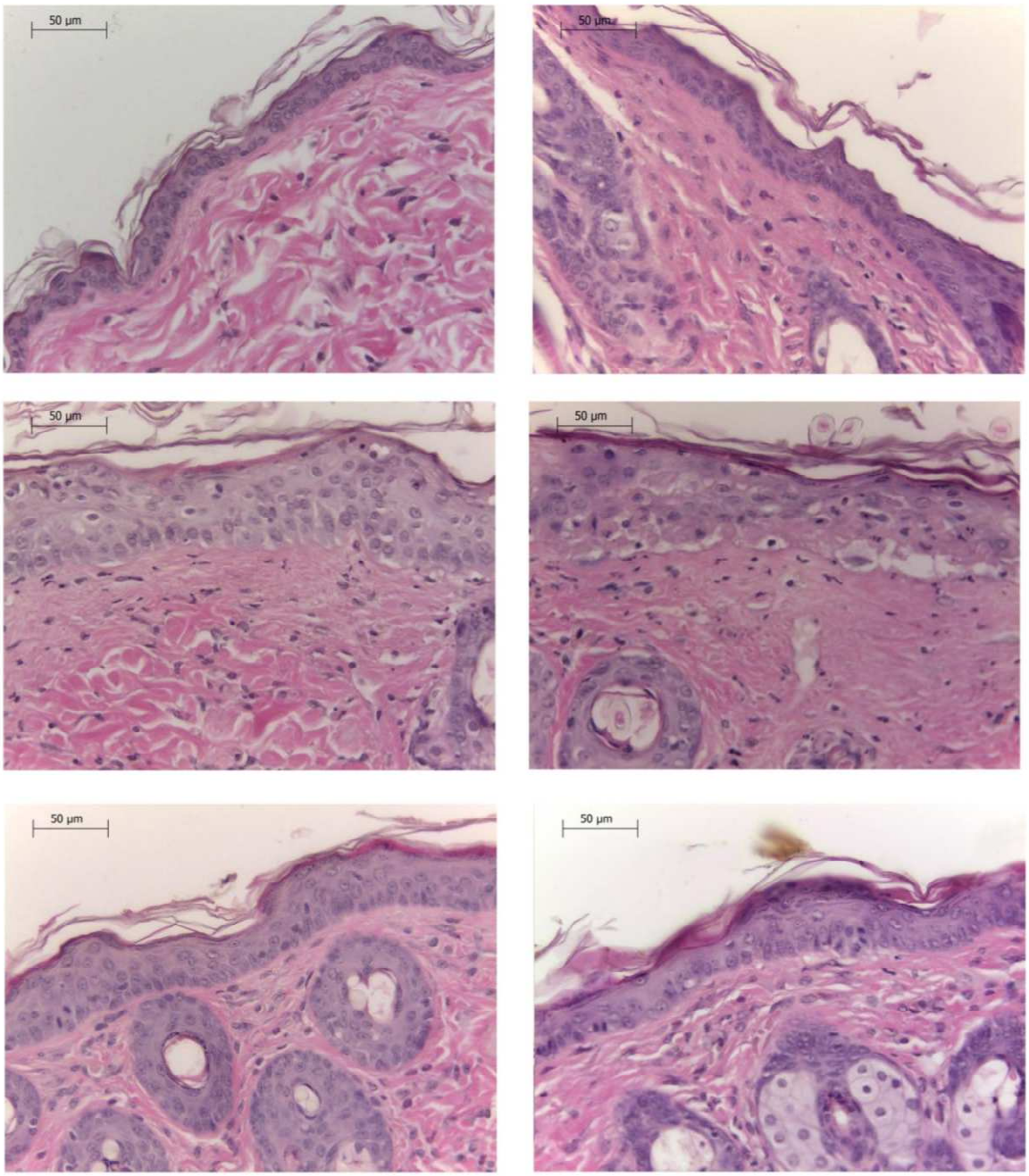
6.2.4 Análise da epiderme viável

Na Figura 31 observa-se as alterações histopatológicas na epiderme viável, induzidas ou não por radiação UV, através de fotomicrografias derivadas da pele de animais distribuídas por grupo: NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica e irradiado; COM + UV: Aplicação tópica de Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado.

Nos animais com aplicação tópica e irradiados (Grupo FORM + UV), observou-se a diminuição da gravidade dos efeitos histológicos, com hiperplasia reduzida tanto com relação ao número de camadas de células nucleadas quanto à espessura da epiderme, bem como diminuição da formação de células de queimadura solar em comparação com o resultado dos animais sem tratamento e irradiados (Grupo UV). Aspecto semelhante pode ser observado no GRUPO COM + UV.

Nos animais sem tratamento e irradiados (GRUPO UV) e (GRUPO BASE + UV), observa-se hiperproliferação celular na epiderme, mostrando que a radiação UV provocou uma hiperplasia na epiderme para reposição de células danificadas, bem como a formação de numerosas células de queimadura solar (queratinócitos apoptóticos) que exibiram característica clássica de apoptose, núcleos picnóticos , um marcador da severidade do dano solar.

Figura 31 - Fotomicrografias: Aspecto microscópico da epiderme de pele de camundongos sem pêlo dos grupos: NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica e irradiado; COM + UV: Aplicação tópica de Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado. (Objetiva de 40x)

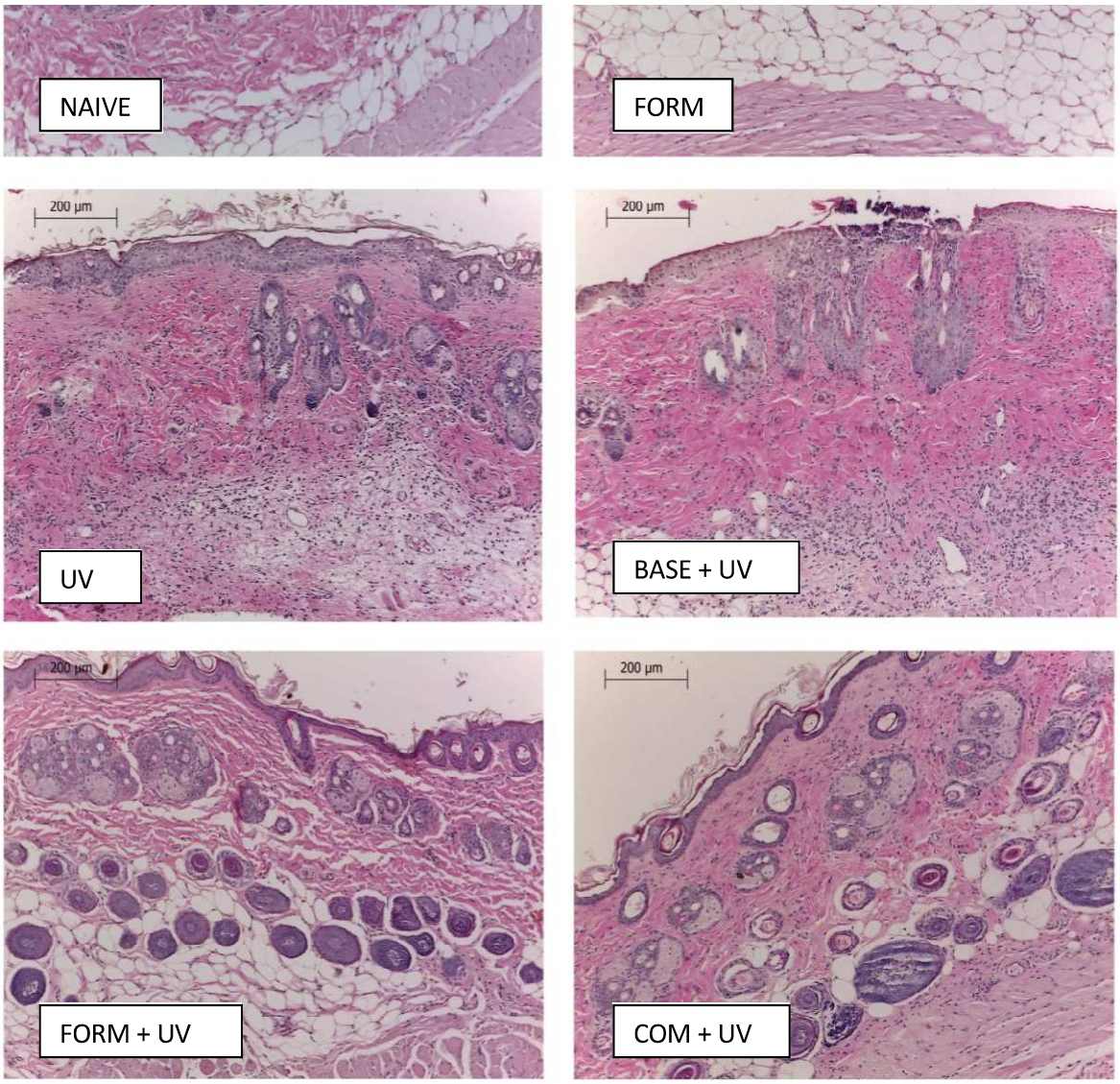


6.2.5 Análise da presença de infiltrados de células inflamatórias nas regiões subepidérmicas

Na figura 32 observa-se as alterações histopatológicas nas regiões subepidérmicas, induzidas ou não por radiação UV, através de fotomicrografias da pele de animais distribuídas por grupo: NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE +UV: Aplicação tópica base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica e irradiado; COM + UV: Aplicação tópica de Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado.

Nos animais irradiados sem aplicação tópica (GRUPO UV) e naqueles com aplicação tópica da base (GRUPO BASE + UV), observa-se uma extensa infiltração de células inflamatórias na derme, o que indica uma resposta inflamatória.

Figura 32 - Fotomicrografias - Aspecto microscópico da derme de pele de camundongos sem pêlo dos grupos: NAIVE: Sem aplicação tópica e não irradiado; FORM: Aplicação tópica e não irradiado; UV: Sem aplicação tópica e irradiado; BASE: Formulação base sem filtros solares e irradiado; FORM + UV: Aplicação tópica e irradiado; COM + UV: Aplicação tópica de Protetor solar comercial com FPS 30 e irradiado.



7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Ao finalizar esse trabalho, pode-se concluir que a caracterização das formulações utilizando diferentes parâmetros serviu de referência para os estudos de estabilidade preliminar e acelerada. Com relação aos tempos e condições de armazenamento, os resultados mostraram que as médias das formulações escolhidas não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$), considerando tamanho de gotícula, condutividade, FPS e espalhabilidade. Já para viscosidade aparente as formulações F1 e F2 apresentaram diferença significativa com 90 dias e 60 dias de estudo, respectivamente, porém apresentaram características sensoriais exigidas pelo consumidos da farmácia magistral, o que permitiu considerar as formulações F1 e F2 estáveis nas condições do estudo. A formulação F5 apresentou diferença significativa para pH após 90 dias de estudo em dois locais de armazenamento, ambiente e luz ultravioleta tendo sido descartada.

A formulação F1, escolhida para prosseguir nos testes in vivo, foi capaz de reduzir a incidência de alterações histopatológicas cutâneas induzidas pela irradiação UV (menor dano ao tecido conjuntivo, menor ocorrência de células de queimadura solar e atenuação da hiperplasia e espessura epidermal).

Ao final obteve-se um fotoprotetor de FPS médio, seguro, de boa espalhabilidade, toque final seco, com estabilidade termodinâmica, economicamente viável, com respaldo científico, através da utilização do planejamento fatorial, ferramenta pouco utilizada na área de cosmetologia.

Referências

REFERÊNCIAS

ALLEN JR., L.V., POPOVICH, N.G., ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, 8ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

APOLINÁRIO, A.C. et al. Optimization of Sunscreen Emulsions Using a Factorial Design Study. **Lat. Am. J. Pharm.,** v.32, n.6, p.830 - 836, 2013.

ASTNER, S.; ANDERSON, R. Skin phototypes 2003. **J. Inv. Dermatol.,** v.122, n.2, p.XXX-XXXI, 2004.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**.2ª ed., Editora Artmed, Porto Alegre,677 p., 2005.

BAGATIN E. Mecanismos do Envelhecimento Cutâneo e o Papel dos Cosmecêuticos. **Rev. Bras. Med.,** n.1, p.5-11, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** 2ª ed., Editora da Unicamp, Campinas, 2001, 299 p.

BECKLUND B.R. et al. UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. **PNAS-Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.107, n. 114, p. 6418-6423, 2010.

BENEVENUTO, C. G., GUERRA, L. O., GASPAR, L. R. Combination of retinyl palmitate and UV-filters: Phototoxic risk assessment based on photostability and in vitro and in vivo phototoxicity assays.**Eur. J. Pharm. Sci.,** v. 68, p.127–136, 2015.

BERGFELD, W.F. Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. **Cosmetic Ingredient Review**, 2008. Disponível em: <http://www.cir safety.org/sites/default/files/115_buff3e_suppl.pdf> Acesso em 22 out 2015.

BOOCK, K.P. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões tópicas contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacau*).** 2007.86 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

BORGHETTI, G. S., KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Rev. Bras. Ciênc. Farm**., v. 42, n. 4, out./dez., 2006.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível

em:<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 26 de junho de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** 1ª ed., Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 47,** de 16 de março de 2006. Aprova o Regulamento técnico Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes. Disponível em:<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/14c345804aee4083b759bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+47,+de+16+de+mar%C3%A7o+de+2006.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 20 jun 2015

BRASIL. ANVISA .Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº67**, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias. Disponível em: < http://www20.Anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-67-de-8-de-outubro-de-2007> Acesso em 04 de nov 2015.

BRASII. ANVISA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos.2ª ed., revista. Brasília:Anvisa, 2008.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 524 p., 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 30**, de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Disponível em:<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e15afe804c58f17fb8f0f8dc39d59d3e/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+N%C2%BA+30,+de+1%C2%BA+de+Junho+de+2012.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 20 jun 2015.

BRENNER, M, HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin, **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, p. 539–549, 2008.

BURKITT, H.G.,YOUG, B., HEATH, J.W. **Pele In: Wheater -Histologia Funcional**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 153-169, 1994.

CABRAL, L. D. S., PEREIRA, S. O., PARTATA , A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.4, n.3, Julho 2011.

CARINI M. et al, Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Il Farmaco,** v 55, p 526–534, 2000.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** v 84, p 21–27, 2006.

COSTA. A. **Tratado Internacional de Cosmecêuticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 716 p.

CHUNG, J.H. et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo.**J. Invest. Dermatol.** v.117, p,1218–1224, 2001.

DAL'BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança cosméticas contendo extratos de chá verde e Ginkgo biloba, 2008.192 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

DRY FLO TM PURE. Disponível em: <http://www.vitalpharmaudia.com.br/site/public_images/produto/ee41849549cabd4006101cc4dfc1cce4.pdf> Acesso em 22 out 2015.

EL-ABASERI T.B., PUTTA S., HANSEN L.A., Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. **Carcinogenesis**, v.27, n. 2, p.225–231, 2006.

EL-DOMYATI, M., et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Exp. Dermatol**., v.11, p. 398–405, 2002.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático de Farmácia Magistral** – V.1, 3ª ed., Pharmabooks, São Paulo, 2008.

FREITAS, J.V. et al. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **Int. J. Pharm**., v.484, p. 132-137, 2015.

GALDAMÉZ E.V.C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**.2002.131p. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos.

GATTEFOSSÉ . Cocoate BG® - Personal Care. 2015a Disponível em : <http://www.gattefosse.com/node.php?articleid=32> Acesso em 22 out 2015.

GATTEFOSSÉ. Emulium 22 - Elegant Paradox.2015b. Disponível em: < http://www.gattefosse.com/en/products/emulium-22.html> Acesso em 18 nov 2015.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. **Rev.. Bras. de Cancerologia,** v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

IMOKAWA, G. et al. Water – relation function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramides. **J. Soc. Cosm.Chem**., v. 40, p. 273-285, 1989.

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Índice de Ultravioleta Máximo**. Disponível em:<http://satelite.cptec.inpe.br/uv/ > Acesso em 05 ago 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, p.57, 2016. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em 05 ago 2016.

JUNG, G.W., TING ,P,T., SALOPEK, T, G. Stability of sunscreens and sunblocks following exposure to extreme temperatures. **J. Am. Acad. Dermatol.,** v. 66, n.6, p. 1007 - 1009, 2012.

KLIGMAN, L.H., KLIGMAN, A.M. The nature of photoageing: its prevention and repair. **Photodermatol.** , v. 3, p.215–227, 1986.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de Achyrocline satureioides. Lam. DC. Compositae. (Marcela).**1991. 228p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre.

KRUTMANN, J. The role of UVA rays in skin aging. **Eur. J. Dermatol.,** v. 11, p.170 - 171, 2001.

LABSPHERE®. **SPF analysis of sunscreen.** Discussion of optical geometry and measurement effects, p.1-12, 2003. Disponível em:< http://webx.ubi.pt/~hgil/FotoMetria/PDF%27s-DOC%27s/Labsphere/SPF-20of-20Sunscreens.pdf> Acesso em 24 de junho de 2015.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Lisboa: Fundação Calouste Goubenkian, 2001. 1517 p.

LAETHEM et al, The sunburn cell: Regulation of death and survival of the keratinocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v 37, p. 1547–1553, 2005.

MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.,** v. 61, n. 3,p. 121-124, 1986.

LAGA A.C., MURPHY G.F. The translational basis of human cutaneous photoaging. **Am. J. Pathol.**, v. 174, p. 357-360, 2009.

LU, Y. et al. Time Course for Early Adaptive Responses to Ultraviolet B Light in the Epidermis of SKH-1. Mice1.**Cancer Res.,** v. 59, p.4591 - 4602, 1999.

MAIA CAMPOS, P. M.B.G et al. In Vitro Antioxidant and In Vivo Photoprotetive Effects of na Association of Bioflavonoids with Lipossoluble Vitamins. Photochem. Photobiol., v. 83, n. 3, p.683-688, 2006.

MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**, 36th ed.London:The Pharmaceutical Press, 2009.3709 p.

MASMOUDI, H. et al. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **Int. J. Pharm**., v.289, p. 117–131, 2005.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Molecular Basis of Photoanging - Review, **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 263 - 269, 2009.

NG, R.L.X. et al. Characterization of regulatory dendritic cells differentiated from the bone marrow of UV-irradiated mice. **Immunology,** v. 140, p. 399–412, 2013.

OLIVEM 900. **Emulsionante natural para formulações de toques não oleoso e suave.** Disponível em: <http://www.biovital.ind.br/2014/index.php/component/content/article/98-download/389-olivem-900> Acesso em 29 out 2015.

OSTERWALDER U., LIM, H.W. **Novel developments in photoprotection**: Part I. In: Lim HW, Hönigsmann H, Hawk JLM. Photodermatology. New York: Informa Healthcare USA, p 279 - 295, 2007.

OUHTIT, A. et al. Temporal events in skin injury and the early adaptative responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. **Am. J. Pathol.**, v. 156, n.1, p. 201-207, 2000.

PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5ª ed., v. 1. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. 663 p.

RANGEL, V.L.B.I.; CORRÊA, M.A.Fotoproteção. **Cosm. Toiletr.,** v.14, p.88-95, 2002.

REBELLO, T. **Guia prático de produtos cosméticos.** 7ª ed. São Paulo:Editora Senac São Paulo, 2008.

RIBEIRO, C.J. **Cosmetologia aplicada a Dermoestética.** 2. Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 243- 246.

RIGO, A.R. et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Eur. J.Pharm. Biopharm.,** v. 93, n.11–17, 2015.

RIGON, R.B. et al, 2013. Influence of natural polymer derived from starch as a sensory modifier in sunscreen formulations. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**., v.5, n.1, p.306 – 309, 2013.

RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev. Port. Farm**., v. 45, n.1, p. 52 – 59, 1995.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: novas perspectivas sobre a fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletr**., v. 8, n. 4, p, 51-55, 1996.

RODRIGUES, M.I., LEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, 3 ª Ed., Campinas: Cárita Editora, 2014. 357p.

RYSER, S. et al. **UVB-Induced Skin Inflammation and Cutaneous Tissue Injury Is Dependent on the MHC Class I–Like Protein, CD1d**. Journal of Investigative Dermatology. v.134, 192–202, 2014.

SBD – **Programa Nacional de Combate ao Câncer de Pele 2015**. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/acoes/programa-nacional-de-combate-ao-cancer-da-pele> Acesso em 17 de junho de 2015.

SCHALKA, S., REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **An. Bras Dermatol.**, v.86, n.3, p.507- 515, 2011.

SCHALKA et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An Bras Dermatol.,** v.89, n.6 Supplement 1, p. 1-74, Nov/Dec 2014.

SHEEHAN J.M.,YOUNG A.R., The sunburn cell revisited: un update on mechanistic aspects. Photochem. Photobiol. Sci. 2002, p.365-377,2002.

SHEU, M.T. et al. Correlation of in vivo and in vitro measurements of sun protection factor. **J.Food Drug Anal**., v.11, n. 2, p. 128 – 132, 2003.

SILVA, J.A. et al. Aplicação da Metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p.1073-1077, 2008.

SIMIS, T., SIMIS, D.R.C. Doenças da pele relacionadas à radiação solar. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v.8, n.l. p.1-8, 2006

SMAOUI, S.et al. Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. **Arabian J. Chem.,** 2013. No prelo.

SUMMER, B. et al. Sun protection update 1997/8. **South African Pharm.J**., v.4, n.11/12, p. 1-31, 1997.

TANNER, P. R. Sunscreen Product Formulation. **Dermatol. Clín.** v. 24, p. 53-62, 2006.

TEIXEIRA, S.P. Fotoproteção (Revisão). **Rev. Bras.Med**. , v.67, julho, p. 115-122, 2010.

UITTO, J. Biochemistry of the elastic fibres in normal connective tissues and its alterations in disease**. J. Invest. Dermatol**., v. 72, p.1–10, 1979.

VELASCO, M.V.R. et al. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Lat. Am. J. Pharm.,** v.27, n.1, p.23-27, 2008.

VELASCO, M.V.R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**,v.32, n.1, p.27-34, 2011.

VICENTINI, F.T.M.C. et al. Evaluation of Protective Effect of a Water-In-Oil Microemulsion Incorporating Quercetin Against UVB-Induced Damage in Hairless Mice Skin. **J. Pharm. Pharm. Sci.** v. 13, p. 274 - 285, 2010.

VILELA, F. M. P. **Avaliação da segurança in vivo de filtros solares em formulação fotoprotetora.**2012. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

WUNCH, T. Efeitos sinérgicos com filtros UV de alto desempenho. **Cosmet. Toiletr.,** v.13, n.1, p, 54 – 57, 2001.

Anexos

Anexo A - Análise macroscópica das formulações ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento (continuação)

Formulações	T30	T60	T90	T180
F1/F9	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	N/N
F2/F10	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	N/N
F3/F11	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	**LM/LM**	**LM/LM**	**LM/LM**
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	**LM/N**
F4/F12	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	**LM/LM**	**M/LM**	**M/LM**
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	N/N
F5/F13	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	**M/N**	**M/N**	**M/N**
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	N/N

Normal, sem alteração (N)/ Levemente modificada (LM)/
Modificada (M)/Intensamente modificada (IM)

Anexo A - Análise macroscópica das formulações ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento (conclusão)

Formulações	T30	T60	T90	T180
F6/F14	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	N/N	N/N	N/N	N/N
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	N/N	N/N	N/N	N/N
F7/F15	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	M/M	M/M	M/M	M/M
F8/F16	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Geladeira	Geladeira	Geladeira	Geladeira
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Estufa	Estufa	Estufa	Estufa
	M/M	M/M	M/M	M/M
	Luz UV	Luz UV	Luz UV	Luz UV
	M/M	M/M	M/M	M/M

Normal, sem alteração (N)/ Levemente modificada (LM)/
Modificada (M)/Intensamente modificada (IM)

Anexo B – Resultados do tamanho de gotícula ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	1,1030±0,03	0,9904±0,01	1,0397±0,0	1,0285±0,02	1,0415±0,03
	F2	1,0775±0,0	0,9946±0,0	1,0279±0,0	1,0085±0,02	1,0721±0,04
	F5	1,0990±0,03	1,0487±0,0	1,0505±0,0	1,0505±0,0	1,052±0,007
Geladeira	F1	1,1030±0,03	0,9844±0,02	1,0377±0,0	1,0446±0,01	1,0293±0,02
	F2	1,0775±0,0	1,0019±0,02	1,0281±0,02	1,0288±0,01	1,0827±0,03
	F5	1,0990±0,03	1,0054±0,02	1,0199±0,0	1,0449±0,01	1,0336±0,01
Estufa	F1	1,1030±0,03	1,0102±0,02	1,0207±0,01	1,0368±0,02	0,9888±0,02
	F2	1,0775±0,0	0,9962±0,03	1,0318±0,02	1,0341±0,01	1,0084±0,003
	F5	1,0990±0,03	1,0147±0,03	1,0864±0,03	1,0031±0,01	1,0491±0,03
Luz UV	F1	1,1030±0,03	1,0580±0,08	1,0451±0,0	1,0123±0,02	1,0389±0,01
	F2	1,0775±0,0	0,8993±0,04	1,0754±0,04	1,0187±0,01	1,0160±0,01
	F5	1,0990±0,03	0,9530±0,06	1,0975±0,0	1,0504±0,01	1,0548±0,02

Anexo C – Resultados do pH ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	5,95±0,02	5,83±0,04	6,01±0,07	5,86±0,0	5,91±0,06
	F2	5,82±0,07	5,71±0,12	5,83±0,2	5,78±0,07	5,89±0,03
	F5	5,92±0,01	5,85±0,09	5,88±0,01	5,55±0,06	5,97±0,13
Geladeira	F1	5,95±0,02	5,88±0,05	5,82±0,03	6,02±0,11	5,96±0,03
	F2	5,82±0,07	5,84±0,15	5,73±0,14	5,85±0,09	5,88±0,14
	F5	5,92±0,01	5,88±0,04	6,00±0,0	5,96±0,04	6,04±0,06
Estufa	F1	5,95±0,02	5,82±0,04	6,41±0,6	5,82±0,02	5,86±0,08
	F2	5,82±0,07	5,77±0,07	6,11±0,5	5,70±0,13	5,83±0,04
	F5	5,92±0,01	5,91±0,03	5,81±0,12	5,81±0,09	5,87±0,00
Luz UV	F1	5,95±0,02	5,90±0,01	5,79±0,04	5,91±0,02	5,92±0,12
	F2	5,82±0,07	5,74±0,03	5,85±0,18	5,98±0,12	5,79±0,16
	F5	5,92±0,01	5,87±0,007	5,76±0,09	5,83±0,0	5,96±0,06

Anexo D – Resultados da condutividade ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	99,10±1,23	101,10±6,5	104,84±3,83	116,57±2,4	114,2±0,7
	F2	108,79±10,0	97,02±12,5	127,94±6,86	127,80±7,07	124,5±13,9
	F5	98,77±5,98	94,97±3,5	126,51±8,77	115,00±1,41	122,7±16,6
Geladeira	F1	99,10±1,23	87,10±3,95	120,94±2,21	111,90±7,11	128,8±2,96
	F2	108,79±10,0	102,52±7,23	126,80±14,38	123,57±3,06	139,4±9,63
	F5	98,77±5,98	90,97±3,01	115,83±6,08	118,30±2,64	133,29±5,07
Estufa	F1	99,10±1,23	97,04±9,26	122,49±16,66	122,40±5,27	138,12±10,6
	F2	108,79±10,0	103,30±7,33	122,32±4,45	113,03±22,7	150,77±17,1
	F5	98,77±5,98	88,52±0,55	128,53±7,39	129,00±7,17	151,67±16,4
Luz UV	F1	99,10±1,23	101,93±0,28	119,04±4,0	123,40±3,42	133,7±6,26
	F2	108,79±10,0	108,48±5,58	130,00±2,5	128,22±22,1	126,2±25,4
	F5	98,77±5,98	107,09±2,28	103,30±18,56	116,59±0,82	115,2±25,2

Anexo E – Resultados da espalhabilidade ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	1,7559±0,28	2,0165±0,27	2,1288±0,26	2,1394±0,03	1,6991±0,14
	F2	1,7962±0,07	1,8746±0,36	2,0934±0,32	1,9728±0,04	1,6559±0,014
	F5	1,6269±0,41	2,0412±0,14	2,1202±0,03	2,1252±0,04	1,4972±0,11
Geladeira	F1	1,7559±0,28	1,9667±0,14	2,3432±0,05	2,1387±0,12	1,0293±0,11
	F2	1,7962±0,07	1,9713±0,35	2,2865±0,01	2,1859±0,02	1,0827±0,03
	F5	1,6269±0,41	2,0501±0,33	2,7273±0,21	2,0918±0,01	1,0336±0,01
Estufa	F1	1,7559±0,28	2,0257±0,08	2,2817±0,16	1,6147±0,27	0,9888±0,02
	F2	1,7962±0,07	1,8201±0,36	2,1215±0,03	1,6852±0,09	1,0084±0,003
	F5	1,6269±0,41	1,7051±0,16	2,2602±0,1	1,5632±0,05	1,0491±0,033
Luz UV	F1	1,7559±0,28	1,0580±0,01	2,3806±0,33	2,0170±0,16	1,8797±0,48
	F2	1,7962±0,07	0,8993±0,04	2,3481±0,07	1,9928±0,34	1,8743±0,15
	F5	1,6269±0,41	0,9530±0,1	2,1213±0,36	2,0120±0,17	1,5326±0,07

Anexo F – Resultados da viscosidade ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	12328±9,89	12266±59,3	12346,67±9,8	12363,5±4,94	12358,5±4,9
	F2	12306±1,41	12284±18,3	12359,67±0,5	12354,5±7,77	12346,5±3,5
	F5	12242±35,76	12294±29,6	12360,67±28,3	12352,8±9,19	12346±3,9
Geladeira	F1	12328±9,89	12311±9,89	12343±35,52	12352,5±23,3	12339,3±11,3
	F2	12306±1,41	12322,5±19,09	12363,5±2,12	12357±8,48	12355,2±19,0
	F5	12242±35,76	12318±22,62	12334±21,21	12339,5±25,1	12338,9±21,0
Estufa	F1	12328±9,89	12295,5±68,6	12361,5±0,7	12326±29,6	12357±11,31
	F2	12306±1,41	12324±7,07	12344±9,8	12338±18,3	12349±7,07
	F5	12242±35,76	12330,5±43,1	12337,5±6,36	12326,4±29,2	12318±1,41
Luz UV	F1	12328±9,89	12325,5±0,7	12332,5±12,02	12326,2±7,7	12354±13
	F2	12306±1,41	12378,5±44,54	12343,5±3,53	12351±19,3	12360,3±14,0
	F5	12242±35,76	12350±8,48	12338±19,79	12327±8,48	12363,7±7,23

Anexo G – Resultados do FPS ao longo do tempo e nas diferentes condições de armazenamento

Condições armazenamento	Formulações	Tzero	T30	T60	T90	T180
Ambiente	F1	26±0,0	26,5±0,7	26,5±0,7	28±0,0	28±0,5
	F2	26±1,4	26,5±0,7	26,5±0,7	29±1,4	29±1,0
	F5	27±0,0	27±1,4	27±1,4	27±1,4	29±0,5
Geladeira	F1	26±0,0	27±1,41	29±1,41	26,5±0,70	27±1,4
	F2	26±1,4	27,5±2,12	27±1,41	26,5±0,70	26±0,7
	F5	27±0,0	26±0,0	27,5±0,7	26,5±0,70	27±1,4
Estufa	F1	26±0,0	26±0,0	32±0,0	27,5±4,94	29±2,1
	F2	26±1,4	25,5±0,7	31±7,07	31±1,41	31±0,7
	F5	27±0,0	29,5±7,7	32,5±3,53	31,5±0,70	31±1,4
Luz UV	F1	26±0,0	26±0,0	26,5±0,7	26±2,82	25±1,4
	F2	26±1,4	26±0,0	29±1,41	28±0,0	27±0,7
	F5	27±0,0	27±0,7	28±0,0	26±0,0	26±0,7