



Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão

Velasco, M.V.R.¹; Balogh, T.S.¹; Pedriali, C.A.^{1*}; Sarruf, F.D.¹; Pinto, C.A.S.O.¹; Kaneko, T.M.¹; Baby, A.R.¹

¹Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil.

Recebido 14/09/2010 / Aceito 03/12/2010

RESUMO

Atualmente, são utilizadas técnicas *in vitro* e *in vivo* para a avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção de UVA (FPA). O presente trabalho propõe a revisão das técnicas para as avaliações desses fatores *in vitro* preconizadas por FDA (*Food and Drug Administration Agency*) e COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*). O enfoque maior foi direcionado à análise espectrofotométrica de soluções diluídas e à espectrofotometria de reflectância com esfera integrada.

Palavras-chave: Espectrofotometria. Fotoproteção. UVA. UVB. Revisão.

Ação da radiação ultravioleta e fotoproteção

Os primeiros estudos referentes à medição da eficácia de um fotoprotetor, realizados primeiramente por Schulze (1963), envolveram a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). O conceito de FPS foi popularizado, em 1984, por Franz Greiter, que também estudou e descreveu a metodologia de desenvolvimento e avaliação de fotoprotetores que apresentam resistência à água (Greiter & Gschnait, 2008). No ser humano, os sistemas naturais de proteção e prevenção frente às exposições repetitivas à radiação ultravioleta (UV) envolvem: (a) secreção sudorípara contendo ácido ascórbico, enzima superóxido dismutase, vitamina E e ácido urocânico; (b) pigmentação (melanina) e (c) espessamento da camada córnea (Kullavanijaya & Lim, 2005; Urbach, 2001). As radiações UVA (ultravioleta A) e UVB (ultravioleta B) são responsáveis pelo equilíbrio entre a ativação e inibição dos sistemas antioxidantes por mecanismos distintos, tendo como consequência a alteração da homeostase cutânea. A radiação UVB (290-320 nm) é responsável pelos danos imediatos causados pela radiação solar por causa da sua energia elevada, ao passo que a UVA (320-400

nm) induz uma série de alterações celulares, envolvendo os fibroblastos e melanócitos, devido ao poder de maior penetrabilidade através da pele (Flora & Ferguson, 2005).

De acordo com a intensidade, o tempo de exposição à radiação UV, a susceptibilidade genética e a pigmentação da pele, o organismo humano pode manifestar alterações fisiológicas, entre elas processo inflamatório caracterizado pelo desenvolvimento de eritema ou queimaduras de graus variados, edema, calor e elevação dos níveis de substâncias como as prostaglandinas e leucotrienos (Lautenschlager et al., 2007; Taylor, 2005; Rabe et al., 2006). Outras modificações incluem a mobilização de neutrófilos e ativação do sistema NADPH oxidase, o que gera uma série de espécies reativas oxidantes. O resultado disso é uma alteração no sistema imunológico com a diminuição de células alteradas devido às mudanças na produção de citocinas pelos queratinócitos, na expressão genética de moléculas de adesão e na ativação dos melanócitos (aumento da síntese de melanina) - esta última alteração pode ser constatada pelo bronzeamento duradouro da pele. Além disso, ocorre espessamento da camada córnea e redução de alguns fatores, como firmeza, elasticidade e hidratação da pele (Lautenschlager et al., 2007; Taylor, 2005; Rabe et al., 2006). Outras alterações podem ocorrer em função dos efeitos crônicos da exposição solar, como o aumento da expressão do gene p53, que é um indicador de mutações e risco de câncer de pele (Baron et al., 2008; Lautenschlager et al., 2007; Naik et al., 2007; Morales-Molina et al., 2006; Afaq et al., 2005; Kullavanijaya & Lim, 2005).

Como exposto acima, as radiações UVA e UVB estão associadas ao dano cumulativo à pele durante os anos de vida do indivíduo; portanto, torna-se de grande importância a avaliação da eficácia dos fotoprotetores.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica de artigos nacionais e internacionais no período de 1963 a 2009, desde os primeiros estudos referentes à avaliação da eficácia fotoprotetora até a atualidade, envolvendo técnicas para as avaliações de FPS (UVB) e FPA (Fator de Proteção UVA) tanto *in vitro* como *in vivo*. O levantamento da literatura em torno de 50% das referências pesquisadas estão entre os anos de 2005 a 2009.

Os métodos padronizados que constam na literatura podem orientar em procedimentos de determinações, porém no Brasil são comumente empregados aqueles preconizados pelo FDA (*Food and Drug Administration Agency*, 1999) e pela COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association of the Scientific Committee on Cosmetology of the Commission of the European Union*, 1994).

Autor correspondente: Carla Aparecida Pedriali - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - FCF - USP - Avenida Prof. Lineu Prestes, 580, bls. 13/15 - Conjunto das Químicas - Cidade Universitária - CEP.05508-900 - São Paulo - SP - Brasil - fone: 11 3091-3623/fax: 11 3815-4418 e-mail: capedriali@hotmail.com

Para a análise do FPA (Fator de Proteção UVA), existe o método recomendado pela Associação das Indústrias Cosméticas do Japão (JCIA), também utilizado nos Estados Unidos e que está em implantação no Brasil. Demais métodos apresentam-se descritos na Norma Australiana (em processo de implantação) e na COLIPA (Naik et al., 2007; *Scientific Committee on Cosmetology of the Commission of the European Union*, 1994).

O princípio da avaliação do FPS, comumente utilizado no Brasil e aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conforme a RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002, envolve o aparecimento do eritema na pele, decorrente da exposição à radiação UVB e cuja intensidade é proporcional à dose recebida. O valor de FPS (**Equação 1**) consiste na razão entre o tempo de exposição à radiação UVB necessário para desenvolver eritema na pele protegida pelo fotoprotetor e o tempo, para o mesmo efeito, com a pele desprotegida, sem aplicação de qualquer produto. Para tal determinação, é preconizado no Brasil o emprego de metodologia *in vivo* com voluntários sadios e com Fototipos I, II e III (pele muito sensível, sensível e normal, respectivamente, segundo Fitzpatrick, 1975), de acordo com resolução RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002 (Brasil, 2002).

$$\text{Equação 1} \quad \text{FPS} = \frac{\text{DME (pele protegida)}}{\text{DME (pele desprotegida)}}$$

Onde: DME = Dose mínima da radiação capaz de formar o eritema mínimo

Para a avaliação da proteção UVA, o método mais comumente utilizado envolve o cálculo de FPA-PPD (*Persistent Pigment Darkening*). Esse princípio se baseia na resposta de pigmentação tardia (duas a quatro horas) ou persistente da pele frente à radiação UVA, pois seu escurecimento é uma das respostas mais imediatas a esse tipo de exposição. Nesse método *in vivo* são analisadas respostas de pigmentação na pele de dez voluntários sadios com peles Fototipos II, III e IV (pele sensível, normal e minimamente sensível, respectivamente, segundo Fitzpatrick, 1975), sendo que a dose de UVA adequada corresponde a aproximadamente 15 J/cm² após o término da exposição à radiação UVA de duas a quatro horas (Baron et al., 2008; Moyal et al., 2006).

Tanto o FPS quanto o FPA-PPD são métodos que envolvem seleção de voluntários, custo elevado, acompanhamento de técnicos especializados, médicos e equipamentos de alto custo e calibrados, dentre outras exigências. São realizados apenas na fase final do desenvolvimento de formulações em função da complexidade e custo.

Outro método utilizado é o cálculo de IPD (*Immediate Pigment Darkening*), que envolve a observação do escurecimento transitório da pele (bronzamento) de dez voluntários sadios com peles Fototipos II, III e IV, sendo que a dose de UVA corresponde a aproximadamente 1 a 6 J/cm² e, após um a 15 minutos de exposição, o efeito desaparece. O comprimento de onda induzido de eficiência máxima de IPD é, aproximadamente, de 340 nm (Routaboul & Denis, 1999).

As análises dos Fatores de Proteção frente à radiação UVB e UVA *in vivo*, antes descritas, são empregadas e aceitas por diversos países; porém, são complexas e possuem custo elevado, principalmente por envolver tecnologia onerosa, contratação de técnicos especializados e emprego de voluntários humanos. Perante o exposto, existem diversas vantagens em utilizar as metodologias *in vitro* na triagem durante o desenvolvimento de formulações cosméticas e estas podem apresentar correlação

adequada com os resultados dos métodos *in vivo* (Flor et al., 2007).

Metodologias de análise da eficácia fotoprotetora *in vitro*

Neste artigo, há uma descrição dos métodos espectrofotométricos de análise da eficácia fotoprotetora *in vitro*.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens, como a rapidez de execução, o custo acessível, a reprodutibilidade, a facilidade no treinamento do operador e a não exposição do voluntário ao risco, entre outras (Sayre et al., 2008; Rai & Srinivas, 2007).

Análise espectrofotométrica de soluções diluídas

A determinação do FPS *in vitro* de filtros químicos pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas (também reconhecida como Método de Mansur) e posterior tratamento matemático por meio da determinação da transmitância ou da absorbância ($T = 10^{-Abs}$). Para essa técnica, são utilizados os solventes (e brancos de leitura) metanol, isopropanol ou etanol. Segundo a Lei de Lambert-Beer (1760), a transmitância independe do valor absoluto da luz incidente e a fração desta, que é absorvida pelo meio, é proporcional à distância percorrida e independe da intensidade da luz incidente (fonte de luz natural ou artificial) (Sayre et al., 2008; Mansur et al., 1986). Esse método não pode ser empregado para a avaliação de fotoprotetores contendo filtros físicos em função da insolubilidade destes nos solventes comumente utilizados (Mansur et al., 1986; Sayre et al., 1979). O cálculo do FPS é obtido pela **Equação 2**, conforme Mansur et al. (1986) e Sayre et al. (1979) e os demais dados envolvidos no cálculo estão expostos no **Quadro 1**.

$$\text{Equação 2} \quad \text{FPS} = E \cdot \sum_{290\text{nm}}^{320\text{nm}} E(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção;

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ);

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

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da formulação em solução no comprimento de onda (λ).

Quadro 1. Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria (Mansur et al., 1986; Sayre et al., 1979) com um fator de correção igual a dez.

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

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ);

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

No trabalho de Santos et al., (1999) foi realizado um estudo comparativo entre os valores, obtidos pelo Método de Mansur (*in vitro*) e por metodologia *in vivo*, de FPS de fotoprotetores em loção contendo 4-metoxicinamato de 2-etilhexila. Foram avaliados três fotoprotetores em loção com concentrações de 2,0, 4,5 e 7,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, diluídas a 2,0 $\mu\text{L/ml}$ em

etanol P.A., e realizadas as leituras em espectrofotômetro em um comprimento de onda que variou de 290 a 320 nm. A metodologia *in vivo* foi realizada com 16 voluntários com Fototipos de pele I, II e III. Os valores obtidos no ensaio *in vivo* se correlacionaram com resultados do método *in vitro*. O fotoprotetor em loção a 2,0% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila apresentou valores de FPS *in vitro* e *in vivo* de $4,6 \pm 0,05$ e $5,0 \pm 0,1$ respectivamente. As outras formulações fotoprotetoras apresentaram valores de FPS correlacionadas como se segue: concentração de 4,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (FPS $9,9 \pm 0,01$ na metodologia *in vitro* e $9,8 \pm 2,2$ na metodologia *in vivo*) e concentração de 7,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila (FPS $15,3 \pm 0,002$ em ensaio *in vitro* e $15,8 \pm 4,4$ em ensaio *in vivo*) (Santos et al., 1999).

O grupo de pesquisa de Garcia et al., (1991) realizou a observação utilizando diferentes tipos de filtros solares (salicilato de homomentila; sal monossódico do ácido 2,2'-bis-(2,4-fenileno)-1H-benzimidazol 4,6-dissulfônico; 4-dimetilaminobenzoato de etila; 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona, 3-benzilideno cânfora; 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona; 4-metoxicinamato de 2-etilhexila) em três níveis de concentração (mínima, intermediária e máxima) de acordo com o FDA (Lowe & Shaath, 1990). Os valores de FPS das formulações foram determinados pelo método de Mansur. Por meio deste ensaio, foi constatado que as formulações que continham 4-dimetilaminobenzoato de etila nas concentrações de 1,5, 4,0 e 8,0% tiveram valores de FPS 3, 7 e 15, respectivamente, e as que continham o filtro 4-metoxicinamato de 2-etilhexila nas concentrações de 2,0, 4,5 e 7,5% tiveram valores de FPS de, respectivamente, 4, 7 e 12. A conclusão deste trabalho é que diferentes filtros químicos UVB utilizados em formulações distintas apresentaram resultados de FPS correlacionados com as concentrações, fornecendo informações importantes no desenvolvimento dessas formulações (Garcia et al., 1991).

O trabalho de Rosa et al., (2008) avaliou espectrofotometricamente o FPS de extratos vegetais aquosos de *Achillea Millefolium*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (jacq.) Cass e *Sonchus oleraceus*. A análise espectral dos extratos em uma concentração de 10% (massa de planta triturada/volume de água) demonstrou que há ação fotoprotetora quanto às radiações UVA e UVB, resultando em FPS, aproximadamente, de oito para *Achillea*, seis para *Sonchus*, cinco para *Porophyllum* e *Brassica*, dois para *Plectranthus* e um para *Cyperus*. Os autores concluíram que estudos como esse são relevantes na pré-seleção de espécies vegetais que apresentam potencial de FPS de forma conveniente e de custo reduzido (Rosa et al., 2008).

Determinação do fator da eficácia fotoprotetora *in vitro* por transmitância difusa

Transmitância difusa e Geometria Óptica

Outro método *in vitro* descrito na literatura para a avaliação de FPS de protetores solares envolve a transmitância difusa. A intensidade de luz incidida sobre os fotoprotetores como sistemas opacos se dá conforme uma distribuição hemisférica apresentada na **Figura 1**. A intensidade de radiação é maior na proximidade da incidência para a direção regular transmitida (direção hemisférica). A principal vantagem desse método é a determinação de FPS de formulações contendo filtros físicos, como o dióxido de titânio e óxido de zinco (Moyal, 2008; Levy, 2007; Springsteen et al., 1999).

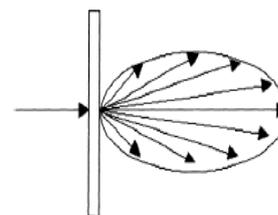


Figura 1. Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor (Springsteen et al., 1999).

A transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração que coleta a luz dispersada em todos os ângulos. A geometria para esse caminho de espalhamento da luz é conhecida como normal/hemisférico (incidência/transmitância difusa) e é frequentemente abreviado por geometria $0^\circ/d$ (difusa) (Springsteen et al., 1999).

Ao longo dos anos, muitos pesquisadores da engenharia óptica estudaram meios de elevar a eficiência do sistema radiométrico dos instrumentos de medição da transmitância difusa. Construíram, portanto, aparelhos com sistemas de melhor razão sinal/ruído, pois o ruído interferia significativamente no sinal dos resultados experimentais, além da menor exposição da amostra ao meio de uma luz UV. A melhor construção da geometria radiométrica para atender esses parâmetros de análise foi aquela elaborada em sua ordem reversa abreviada como $d/0^\circ$ (difusa/normal), conforme indicado na **Figura 2** (Springsteen et al., 1999).

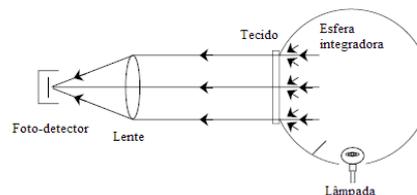


Figura 2. Geometria difusa/normal ($d/0^\circ$). Adaptação de Springsteen et al. (1999).

O analisador de transmitância UV, com tecnologia de esfera integradora, utiliza o desenho óptico com a geometria descrita anteriormente. A lâmpada de xenônio com energia suficiente para o intervalo espectral de 250 a 450 nm é usada no interior da esfera integradora. A amostra é aplicada em substratos (simuladores alternativos da pele humana) sob a forma de camada de 2 mg/cm ou 2 μ L/cm. O caminho óptico da passagem da luz é de 10 mm (1cm) de diâmetro (Moyal, 2008; Levy, 2007; Springsteen et al., 1999).

Parâmetros analíticos

- **FPS *in vitro***: a determinação envolve a medida da transmitância espectral dos comprimentos de onda UV entre 280 nm e 400 nm com o intuito de avaliação de FPS (**Equação 3**) e FPA (Pissavini et al., 2007; Raí & Srinivas, 2007; Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999; Sayre et al., 1979).

$$\text{Equação 3} \quad \text{FPS} = \frac{\int_{280m}^{400m} E\lambda \cdot S\lambda \cdot d\lambda}{\int_{280m} E\lambda \cdot S\lambda \cdot T\lambda \cdot d\lambda}$$

Onde:

E_{λ} = Eficácia espectral de desenvolvimento de eritema (290–320 nm);

S_{λ} = Região espectral relativa onde abrange a radiação solar (300–400 nm);

T_{λ} = Transmitância espectral da amostra (medida no aparelho UV-1000S).

O trabalho de pesquisa de Diffey et al., (2000) mostra o potencial fotoprotetor de vários filtros químicos (Figura 3) em 59 formulações comerciais. Houve a avaliação dos valores dos comprimentos de onda críticos, assim como a medição do espectro de cada filtro químico incorporado em emulsões óleo em água (O/A). Isso foi realizado por meio da transmitância difusa

com esfera integradora usando o substrato de colágeno sintético hidratado (*Vitro-Skin*[®]) e o comprimento de onda de 290 a 400 nm. Os autores concluíram que esse procedimento *in vitro* é um dos mais usados rotineiramente na Indústria Cosmética, possuindo um baixo custo e sendo confiável para a medição da proteção solar de amplo espectro dos filtros químicos incorporados. Neste ensaio, não houve a preocupação da determinação dos valores de FPS e sim de outros parâmetros, como comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB (Diffey et al., 2000).

- **Razão UVA/UVB ou Boots' Star Rating:** envolve a medida de absorção da formulação no intervalo de 290 a 400 nm. Após esse processo, é feito o cálculo da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB (Equação 4) (Boots the Chemists, 2004; Rudolph, 2004; Springsteen et al., 1999).

Figura 3. Bandas de absorção e comprimentos de onda críticos para os filtros químicos mais usados (Diffey et al., 2000).

| Filtro UV (INCI) | Concentração (%) [*] | Comprimento de onda (nm) | | | | | | | | | | | | | λ_c (nm) | |
|---|-------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|------------------|-------------------|
| | | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | | | |
| PBSA (2-phenylbenzimidazole -5-sulfonic acid) | 4 | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | 324 [†] |
| OSAL (octyl salicylate) | 5 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | 327 |
| HSAL (homosalate) | 15 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | 328 |
| OPABA (octyldimethyl PABA) | 8 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | 330 |
| OMC (octyl methoxycinnamate) | 7.5 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | 339 |
| OCTO (octocrylene) | 10 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | 356 |
| OXY (oxybenzone) | 6 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | 361 |
| MAN (menthyl anthranilate) | 5 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | 363 |
| TiO ₂ (titanium dioxide) | 25 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | 379 ^{‡§} |
| ZnO (zinc oxide) | 25 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | 382 [†] |
| AVO (avobenzone) | 3 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | 383 |

λ_c - comprimento de onda crítico.

As barras em preto representam a abrangência de radiação UV (os comprimentos de onda estão expressos em nanômetros) e são baseadas em determinações espectrofotométricas. Os filtros foram preparados em emulsões óleo em água (O/A). As barras mais claras representam o pico de absorção de cada filtro.

*A concentração máxima estabelecida pela literatura de produtos fotoprotetores (Pearse & Edwards, 1993).

[†] Determinado em emulsão O/A a 2%.

[‡] Determinado em emulsão O/A a 15%.

A transmitância espectral medida (T_{λ}) é convertida em valores de absorbância espectral $A_{\lambda} = -\log(T_{\lambda})$

$$\text{Equação 4} \quad \frac{UVA}{UVB} = \frac{\int_{320m}^{400m} A_{\lambda} \cdot d\lambda}{\int_{290m}^{320m} A_{\lambda} \cdot d\lambda}$$

A razão entre a curva UVA/UVB é determinada e associada com a proteção frente à radiação UVA. Os resultados podem ser expostos com estrelas, sendo que o maior número destas corresponde a uma maior proteção antiUVA estimada (Quadro 2).

Quadro 2. Sistema Boots' Star Rating relacionado com a razão UVA/UVB conforme Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA (2004) (Levy, 2007; Boots the Chemists, 2004).

| Razão UVA | Proteção AntiUVA | |
|---------------|------------------|------------------------|
| | Estrelas | Descrição ^a |
| 0,0 até < 0,2 | - | Muito baixa |
| 0,2 até < 0,4 | * | Moderada |
| 0,4 até < 0,6 | ** | Boa |
| 0,6 até < 0,8 | *** | Superior |
| 0,8 até < 0,9 | **** | Máxima |
| ≥ 0,9 | ***** | Ultra |

^aDescrição da relação da razão UVA (proteção a esta radiação) com a quantidade de estrelas.

Estudos realizados por Velasco et al., (2008) e Baby et al., (2009) evidenciam que formulações contendo rutina, associada ou não a filtros químicos como o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, mostram uma eficácia fotoprotetora *in vitro*. Este ensaio foi realizado por meio da espectrofotometria de transmitância difusa com esfera integradora. A rutina é um flavonoide utilizado nos casos de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, reduzindo a fragilidade capilar e, também, atuando como agente inibidor do processo de formação de radicais livres em vários estágios (Pedriali et al., 2008; Colipa Project Team IV, 2007). Neste estudo, os autores verificaram que a rutina a 0,1% p/p apresentou propriedades fotoprotetoras frente à radiação UVA, apresentando, na forma isolada, valor de comprimento de onda crítico igual a 385 nm, estatisticamente superior ao valor de 370 nm, que é um valor indicado como adequado na proteção à radiação UVA (Boots the Chemists, 2004; Springsteen et al., 1999). A razão UVA/UVB para a mesma formulação (rutina 0,1% p/p) gerou valor de $0,95 \pm 0,13$, que correlaciona a área de absorção de UVA e a radiação UVB e esse valor, quando superior a 0,92, representa uma proteção maior. No entanto, as associações desse flavonoide com os filtros 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, nas proporções distintas empregadas, resultaram na diminuição desses parâmetros, descritos no Quadro 3 (Baby et al., 2009; Velasco et al., 2008).

Quadro 3. Proteção frente à radiação UVB (FPS) e à UVA avaliada por meio da determinação do comprimento de onda crítico (λ_c) e razão UVA/UVB (Velasco et al., 2008; Guilles et al., 2003).

| Fotoprotetores (% p/p) | FPS | λ_c | Razão UVA/UVB |
|---|--------------|-------------|---------------|
| Emulsão base | 1,11 ± 0,01 | 386 | 0,77 |
| Emulsão com rutina 0,1% | 1,23 ± 0,03 | 385 | 0,95 |
| Emulsão com MCO 3,5% + BZF 1,0% | 7,34 ± 0,24 | 359 | 0,44 |
| Emulsão com rutina 0,1% + MCO 3,5% + BZF 1,0% | 9,97 ± 0,18 | 363 | 0,46 |
| Emulsão com MCO 7,0% + BZF 2,0% | 14,63 ± 2,05 | 361 | 0,49 |
| Emulsão com rutina 0,1% + MCO 7,0% + BZF 2,0% | 14,96 ± 1,41 | 363 | 0,50 |

MCO: p-metoxicinamato de octila. BZF: benzofenona-3 (n = 4).

- **Comprimento de onda crítico:** o espectro de absorvância de um produto é determinado no intervalo de 290 a 400 nm. O comprimento de onda crítico (λ_c) é aquele que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre os referidos comprimentos de onda. Um fotoprotetor, para ser indicado como adequado na proteção à radiação UVA, deve apresentar valor de λ_c maior que 370 nm. Quanto maior o valor de comprimento de onda crítico, maior será a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, o comprimento de onda crítico não leva em consideração a intensidade de todo espectro, possibilitando que um filtro com proteção inferior possa apresentar mesmo valor de λ_c que outro, com proteção superior (**Equação 5**) (Rai & Srinivas, 2007; Boots the Chemists, 2004; Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999).

$$\text{Equação 5} \quad R = \frac{\int_{290m}^{\lambda_c} A\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290m}^{400m} A\lambda \cdot d\lambda}$$

O comprimento de onda crítico é definido como o primeiro valor considerado quando a razão (R) for $\geq 0,9$. A descrição dos potenciais estão informados no **Quadro 4** (Boots the Chemists, 2004; Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999).

Quadro 4. Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção e a razão UVA/UVB (Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999).

| λ_c | Nível de proteção (Razão UVA/UVB) |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 340 nm $\leq \lambda <$ 370 nm | Intermediária |
| $\lambda_c >$ 370 nm | Maior (amplo espectro) |

Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção à razão UVA/UVB (Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999).

No trabalho de Velasco et al., (2008) foi determinada a eficácia fotoprotetora UVB (FPS) e UVA (*Boots's Star Rating*, a razão de UVA/UVB e o comprimento de onda crítico - λ_c) utilizando a espectrofotometria de transmitância difusa com esfera integradora. A determinação foi realizada em amostras de formulações fotoprotetoras contendo rutina, extrato seco de *Passiflora incarnata* L. e extrato glicólico de *Plantago lanceolata*, associados ou não com filtros químicos (4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físicos (dióxido de titânio). Entre as doze (12) associações dos filtros UV, foi concluído que a associação do extrato seco de *Passiflora incarnata* L. (com concentração equivalente em 0,1% p/p em rutina isolada) com 7% (p/p) de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila, 2% (p/p) de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona e 2% (p/p) de dióxido de titânio apresentou um FPS de 20,072 ± 0,906, o aumento da proteção

contra a radiação UVA com razão de UVA/UVB de 0,49 (sem a presença do extrato) para 0,52 (com a presença do extrato) e o comprimento de onda crítico de 364 para 368,6 nm. Essas associações com extratos vegetais interagem de formas diversas com os filtros químicos e físicos, aumentando ou diminuindo alguns desses parâmetros por um complexo mecanismo fotoquímico, não elucidado até o momento (Velasco et al., 2008).

Em um outro estudo, o de Guilles et al. (2003), foi determinada a eficácia fotoprotetora quanto à radiação UVA da avobenzona e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona em formulações isoladas de 0 a 5% p/p de cada filtro, empregando a Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS), *Phototest* em humanos e técnica *in vitro* (aparelho *Optometrics*) em uma absorção de 320 a 400 nm. Para as medidas do ensaio de DRS, foram selecionados 20 voluntários e a leitura realizada após 20 minutos de aplicação em áreas das costas (5cm x 10cm). Para o *Phototest*, foram utilizados dez voluntários e a medida foi o valor de PPD (*Persistent Pigment Darkening*) como indicador biológico. Os resultados obtidos deste trabalho indicam que os dois métodos realizados com voluntários foram próximos daqueles obtidos com o teste *in vitro*. As formulações com 1,0, 3,0 e 5,0% de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona apresentaram valores de FPA na metodologia DRS *in vivo* de 2,33 ± 0,27; 3,90 ± 0,83 e 4,99 ± 0,81, respectivamente. No teste com o *Phototest* os valores obtidos foram de 1,8 ± 0,4, 2,9 ± 0,3 e 3,7 ± 1,1, respectivamente, e na metodologia *in vitro* (*Optometrics*) os valores de FPA foram 2,51, 4,12 e 5,64, respectivamente (Guilles et al., 2003).

As formulações com concentração de 1,0, 3,0 e 5,0% de avobenzona resultaram em valores de FPA na metodologia DRS *in vivo* de 4,05 ± 0,33, 7,90 ± 1,24 e 10,48 ± 2,12, respectivamente, no *Phototest* resultados de 4,6 ± 1,0, 8,6 ± 2,5 e 10,6 ± 2,2, respectivamente, e na metodologia *in vitro* (*Optometrics*) apresentaram valores de FPA de 4,63, 6,21 e 11,75, respectivamente (Guilles et al., 2003).

Substratos

O substrato ideal para ser utilizado nesta metodologia deve ser opticamente transparente no espectro UV e simular a textura e porosidade da pele humana. Conforme literatura científica, os substratos recomendados e disponíveis comercialmente são:

- **fita cirúrgica (Transpore[®], 3M):** seu uso foi descrito por Diffey et al., (2000) que, juntamente a seu grupo de pesquisa, avaliou 15 fotoprotetores, havendo uma correlação dos valores de FPS obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Esse substrato possui topografia irregular e o fotoprotetor é distribuído de maneira similar à pele humana. Adicionalmente, a fita é utilizada pelo seu baixo custo (Pissavini et al., 2007).

As desvantagens envolvem dificuldades de absorção de formulações alcoólicas e oleosas e pode ocorrer variação no tamanho de poros lote-a-lote (O'Neill, 1984).

- **membrana de colágeno (Viro-Skin[®], IMS):** amplamente utilizada e seus resultados apresentam correlação coerente com os obtidos no ensaio *in vivo*. É necessária sua hidratação antes do uso e apresenta textura similar ao estrato córneo. Dentre as desvantagens estão o custo e o tempo de vida útil reduzido após sua hidratação (Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999).

- **Filme de policloreto de vinila (Saran Wrap[®]):** é um material altamente transmissivo na região do espectro UV-Vis. Esse filme não apresenta textura similar à da pele, porém favorece facilmente a uniformidade da dispersão das amostras sobre sua superfície (Diffey et al., 2000; Springsteen et al., 1999; O'Neill, 1984).

Os demais substratos citados na literatura envolvem a epiderme de rato *hairless* (Sayre et al., 2008; Walter, 1981), a epiderme humana (Sayre et al., 2008; Ferrero et al., 2006) e o estrato córneo fixado em cianoacrilato (Pearse & Edwards, 1993).

A uniformidade do preparo das formulações é um fator importante que é analisado por meio da avaliação de múltiplos

pontos de amostra, distribuída nos substratos, e por meio da avaliação do coeficiente de variação (CV), que pode ser classificado como medida da variação média dos valores de FPS de cada ponto medido: $\leq 10\%$ indica que a amostra foi bem preparada e $> 10\%$ indica que a amostra pode não ter sido muito bem elaborada (Rai & Srinivas, 2007; Springsteen et al., 1999).

Quadro 5. Literatura pesquisada nos últimos dez anos quanto às correlações entre as metodologias de medição de eficácia fotoprotetora *in vivo* e *in vitro*.

| Ano de publicação | Local de realização do estudo | Amostras utilizadas | Metodologia empregada | Conclusão principal |
|---|--|---|---|--|
| 1991 <i>Rev Bras Farm.</i> 2(72):39-41. | Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Brasil). | Formulações contendo filtros químicos UVB e UVA associados ou não em 3 três concentrações: mínima, intermediária e máxima (RDC nº 47/06). | Método de Mansur (<i>in vitro</i>). | As formulações que continham filtros químicos UVB diferentes apresentaram valores de FPS muito próximos. |
| 1999 <i>Int J Cosm Sci.</i> 21(1):1-5. | Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil). | Três loções fotoprotetoras a 2,0, 4,5 e 7,5% de 4-metoxicinamato de 2-etilhexila. | Método de Mansur (<i>in vitro</i>) e por metodologia <i>in vivo</i> . | Os valores obtidos no ensaio <i>in vivo</i> se correlacionaram com resultados do método <i>in vitro</i> . |
| 2000 <i>J Am Acad Dermatol.</i> 2000; 43(6):1024-35. | Departamento Médico e Físico da área do Hospital de Durham (Reino Unido). | Potencial fotoprotetor de vários filtros químicos em 59 formulações comerciais. | Avaliação da eficácia UVA pelo método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): análise do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB. | Este procedimento <i>in vitro</i> é um dos mais usados rotineiramente na Indústria Cosmética, possuindo um baixo custo e sendo confiável para a medição da proteção solar de amplo espectro dos filtros químicos incorporados. |
| 2003 <i>Photodermatol Photoimmunol Photomed.</i> 2003;19:190-4. | Hospital Geral de Massachusetts, Laboratório de Fotomedicina Wellman (Estados Unidos). | Formulações contendo avobenzona e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, isoladas em concentrações de 0 a 5% p/p de cada filtro. | Espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS), <i>Phototest</i> em humanos e técnica <i>in vitro</i> (aparelho <i>Optometrics</i>) numa absorção de 320 a 400 nm. | Os dois métodos realizados com voluntários (DRS e <i>Phototest</i>) foram próximos daqueles obtidos com o teste <i>in vitro</i> (aparelho <i>Optometrics</i>). |
| 2008 <i>Lat Am J Pharm.</i> 27(1):23-7. | Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Brasil) | Formulações contendo rutina, associada ou não a filtros químicos como o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona. | Avaliação da eficácia UVA pelo método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): análise do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB. | A rotina a 0,1% p/p apresentou propriedades fotoprotetoras frente à radiação UVA, apresentando, na forma isolada, valor de comprimento de onda crítico igual a 385 nm, estatisticamente superior ao valor de 370 nm, que é um valor indicado como adequado na proteção à radiação UVA. |
| 2009 <i>Quim Nova.</i> 32:1321-3. | | | | |
| 2008 <i>Int J Pharm.</i> 2008;363(1-2):50-5. | Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Brasil). | Formulações fotoprotetoras contendo rutina, extrato seco de <i>Passiflora incarnata</i> L. e extrato glicólico de <i>Plantago lanceolata</i> , associados ou não com filtros químicos (4-metoxicinamato de 2-etilhexila e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) e físico (dióxido de titânio). | Avaliação da eficácia UVA pelo método de transmitância difusa com esfera integradora (<i>in vitro</i>): análise do comprimento de onda crítico e razão UVA/UVB. | Estas associações com extratos vegetais interagem de formas diversas com os filtros químicos e físicos, aumentando ou diminuindo alguns desses parâmetros por um complexo mecanismo fotoquímico. |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de fotoprotetores é uma necessidade considerada relevante tanto do ponto de vista cosmético como também da saúde pública. Os danos cumulativos causados pelas radiações UVA e UVB, intimamente associados à sua exposição durante os anos de vida do indivíduo, estão relacionados com o envelhecimento cutâneo e o câncer de pele, que é o mais frequente dentre todos os casos de câncer. Nos Estados Unidos, em um período de 1992 a 2001, houve uma incidência de 25% (Food and Drug Administration, 2002).

Existe a preocupação da Indústria de Cosméticos em suas formulações fotoprotetoras e dos Órgãos Governamentais no que se refere à eficácia efetiva dos fotoprotetores existentes no mercado quanto aos fatores de FPS, FPA e suas derivações, sendo o método *in vivo* o mais aceito atualmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. No entanto, no desenvolvimento

das formulações as metodologias *in vitro* podem ser utilizadas na seleção daquela de melhor desempenho com agilidade, facilidade de manuseio, menor custo e com respostas úteis na escolha das preparações que servirão de base para o estudo com voluntários para fins de registro do produto e lançamento no mercado cosmético, visando oferecer um produto de eficácia fotoprotetora comprovada.

AGRADECIMENTOS

CNPq e CAPES

ABSTRACT

New analytical methods for photoprotection effectiveness testing (in vitro) – a review

Currently, both *in vitro* and *in vivo* techniques are used to measure Sun Protection Factor (SPF) and UVA Protection Factor (APF). This paper reviews the *in vitro* techniques to test these factors, recommended by the FDA (USA Food and Drug Administration) and COLIPA (European Cosmetic, Toiletary and Perfumery Association). The main focus is on the spectrophotometric analysis of dilute solutions and the use of reflectance spectrophotometry with an integrating sphere.

Keywords: Spectrophotometry. Photoprotection. UVA. UVB. Review.

REFERÊNCIAS

- Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 2005;571:153-73.
- Baby AR, Balogh TS, Pedriali CA, Kaneko TM, Velasco MVR. UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an *in vitro* assessment. *Quim Nova.* 2009;32:1321-3.
- Baron ED, Kirkland EB, Domingo DS. Advances in photoprotection. *Dermatol Nurs.* 2008;20(4):265-73.
- Boots the Chemist Ltd. (England), The Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA: UVB Ratios According to The Boots Star Rating System. Nottingham: The Boots CO PLC; 2004.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Protetores Solares em Cosméticos. Diário Oficial da União, nº 163, 23 de agosto de 2002. Seção 1E. p. 40.
- Colipa Project Team IV, *In vitro* photoprotection methods, Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products. Guideline, 2007.
- Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, Nash F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(6):1024-35.
- Ferrero L, Pissavini M, Dehais A, Marguerie S, Zastrow L. Importance of substrate roughness for *in vitro* sun protection assessment. *IFSCC Magazine* 2006;9:N2.
- Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J Med Esthet.* 1975;2:33-4.
- Flor J, Davolos MR, Corrêa MA. Protetores solares. *Quim Nova.* 2007;30(1):153-8.
- Flora S, Ferguson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* 2005;591(1-2): 8-15.
- Food and Drug Administration (US). Sunscreen drug products for over-the-counter-human use. *Fed Regist.* 2002;58:28194-302.
- Food and Drug Administration (US). Sunscreen drug products for over-the-counter human use. *Fed Regist.* 1999;64(98):27666-93.
- Garcia S, Santos EP, Lima MTL, Ramos MFS. Avaliação do fator de proteção solar por método *in vitro*. *Rev Bras Farm.* 1991;2(72):39-41.
- Gillies R, Moyal D, Forestier S, Kollias N. Non-invasive *in vivo* determination of UVA efficacy of sunscreens using diffuse reflectance spectroscopy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19:190-4.
- Greiter F, Gschnait F. Effect of UV light on humans. *Photochem Photobiol.* 2008;39(1):869-73.
- Kullavanijaya P, Lim HW. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52:937-58.
- Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet* 2007; 370(9586):528-37.
- Levy SB. Sunscreens. 2nd ed. Wolverton SE, editor. *Philadelphia:* Saunders Elsevier; 2007. p. 703-18.
- Lowe N, Shaath N. The chemistry of sunscreen: development, evaluation and regulatory aspects. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 211-33.
- Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *An Bras Dermatol.* 1986; 61(4):121-24.
- Morales-Molina JA, Grau S, Jiménez-Martín J, Mateu-De AJ, Espona M, Bérge-Fraile MJ, Zarzuelo A, Salas E. Quemaduras solares: fotoprotección y tratamiento. *Ars Pharm.* 2006; 47(2):119-35.
- Moyal D. How to measure UVA protection afforded by sunscreen products. *Expert Rev Dermatol.* 2008; 3(3):307-13.
- Moyal D, Wichrowski K, Tricaud C. *In vivo* persistent pigment darkening method: a demonstration of the reproducibility of the UVA protection factors results at several testing laboratories. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006; 22(3):124-28.
- Naik E, Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol.* 2007; 176(4):415-24.
- O'Neill JJ. Effect of film irregularities on sunscreen efficacy. *J Pharm Sci.* 1984; 73(7):888-91.
- Pearse AD, Edwards C. Human stratum corneum as a substrate for *in vitro* sunscreen testing. *Int J Cosmet Sci.* 1993; 15(6):234-44.
- Pedriali CA, Uchoa AF, Bernusso LC, Polakiewicz B. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Quim Nova.* 2008; 31(8):2147-51.
- Pissavini M, et al. *In vivo* persistent pigment darkening method: proposal of a new standard product for UVA protection factor determination. *Int J Cosmet Sci.* 2007; 29(6):451-60.

- Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55:1-19.
- Rai R, Srinivas CR. Photoprotection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007; 73:73-9.
- Rosa MB, Oliveira TG, Carvalho CA, Silva FD, Carvalho LM, Nascimento PC, Peres RL. Estudo espectrofotométrico da atividade foto-protetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* Var. *Capitata*, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (Jacq.). *Rev Eletr Farm.* 2008; 5(1):101-10.
- Routaboul C, Denis A, Vinche A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol.* 1999; 9:95-9.
- Rudolph T. UVA protection assessment of sunscreens: A critical review on the UVA-to-UVB absorbance ratio. *SÖFWJ.* 2004; 130(9): 28-35.
- Santos EP, Freitas Z M, Souza KR, Garcia S. *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int J Cosm Sci.* 1999; 21(1):1-5.
- Sayre RM, Stanfield J, Bush AJ, Lott DL. Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008; 17(6):278-83.
- Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E. Performance of Six Sunscreen Formulations on Human Skin: A Comparison. *Photochem Photobiol.* 1979; 115:46-49.
- Schulze R. Wirksamkeit von UV absorbem und handelsüblichen sonnenschutzmitteln. *J Soc Cosmet Chem.* 1963; 25:544-65.
- Scientific Committee on Cosmetology of the Commission of the European Union. Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients for their Safety Evaluation - Annex 2: Sun Protection Factor Test Method. 1994; 94-289.
- Springsteen A, Yurek R, Frazier M, Carr KF. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal Chim Acta.* 1999; 380(2-3):155-64.
- Taylor SC. Photoaging and pigmentary changes of the skin. In: Burgess CM. *Cosmetic dermatology.* Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin; 2005. p. 29-49.
- Urbach F. The historical aspects of sunscreens. *J Photochem Photobiol B.* 2001; 64(2-3): 99-104.
- Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASO, Kaneko TM, Baby AR. Associação da rotina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Lat Am J Pharm.* 2008; 27(1):23-7.
- Velasco MVR, Sarruf FD, Salgado-Santos IMN, Haroutiounian-Filho CA, Kaneko TM, Baby AR. *Int J Pharm.* 2008; 363(1-2):50-5.
- Walter JF. Evaluation of seven sunscreens on hairless mouse skin. *Arch Dermatol.* 1981; 117(9):547-50.