

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA
DE ANÁLISE DO TEOR DE FILTROS SOLARES E
DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO* EM
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS COMERCIAIS

RENATA PIETSCH RIBEIRO

RIO DE JANEIRO

2004



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA
METODOLOGIA DE ANÁLISE DO TEOR DE FILTROS
SOLARES E DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO* EM
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS COMERCIAIS**

RENATA PIETSCH RIBEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Adjunto Dra. Sheila Garcia

RIO DE JANEIRO

Junho de 2004

FOLHA DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DO TEOR DE FILTROS SOLARES E DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO* EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS COMERCIAIS

Renata Pietsch Ribeiro

Dissertação submetida ao programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof. _____

(Adjunto)

- Sheila Garcia

Prof. _____

(Titular)

- Érika Rosa Maria Kedor

Prof. _____

(Adjunto)

- Nádia Maria Volpato

Prof. _____

(Adjunto)

- Antônio Jorge Ribeiro da Silva

Rio de Janeiro
2004

Ficha Catalográfica

- R484 Ribeiro, Renata Pietsch
Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais/ Renata Pietsch Ribeiro; orientadora Sheila Garcia. - Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2004.
xviii, 92f. : il. ; 30cm.
- Dissertação (Mestrado) - UFRJ/ Faculdade de Farmácia, 2004.
Referências Bibliográficas: f.65-72.
1. Filtros solares. 2. CLAE. 3. Validação. 4. FPS *in vitro*. 5. Formulações cosméticas.
6. Controle de qualidade. I. Garcia, Sheila. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia. III. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais.

Aos meus pais, Nelson e Teresa,
por me conduzirem até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora Sheila, pelo estímulo, confiança, paciência e pelas tantas cobranças, sem as quais este trabalho iria demorar um pouco mais...

Agradeço à minha família, pais, irmão, marido, tios, primos, por tanta dedicação e cuidados dispensados durante toda minha vida; pelo apoio e incentivos inumeráveis, sem os quais seria impossível esta realização.

À professora Nádia por suas orientações e suporte financeiro, em nome do LabCQ, e aos professores Maurício e Valéria, do LabCQ, por suas orientações e momentos descontraídos durante este período.

À Indústria de Cosméticos Samana pelas ajudas e materiais cedidos;

À Indústria Farmacêutica Spectrum Química pelo gentil fornecimento de matérias primas importantes deste trabalho.

Às amigas e amigos do LabCQ pela amizade e pelos auxílios durante essa jornada.

À Farmácia Alquimia pelo gentil fornecimento de algumas formulações deste trabalho;

À Professora Bete da Farmácia Universitária pelo auxílio na preparação das formulações padrão;

Aos amigos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela amizade, ajuda e bons momentos juntos. Especialmente ao Vinícius que, além da amizade, trabalhou junto, ajudando bastante!

Aos meus amigos que me proporcionam maravilhosos momentos, os quais me dão energia para seguir em frente.

Ao Departamento de Medicamentos pelas dispensas do trabalho e incentivos financeiros em alguns congressos que participei.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Rio de Janeiro, por todos os ensinamentos e dedicação.

E principalmente a Deus, o grande responsável por tudo isso: tudo o que sou, toda a força que tive, a saúde que tenho e as pessoas que colocou ao meu redor.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DO TEOR DE FILTROS SOLARES E DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO* EM FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS COMERCIAIS

Renata Pietsch Ribeiro
Orientador: Sheila Garcia

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Os filtros solares são compostos que absorvem ou refletem a radiação ultravioleta e são utilizados em produtos, considerados cosméticos pela legislação brasileira, para prevenir ou minimizar os efeitos prejudiciais da radiação solar na pele, como eritema, reações fototóxicas, fotoenvelhecimento e câncer de pele. As formulações que surgiram nas últimas décadas ampliaram o espectro de proteção, quando utilizaram mistura de filtros solares, para proteger a pele da radiação ultravioleta, numa faixa maior (UVA e UVB).

Este trabalho mostra o desenvolvimento e validação de um método de avaliação do teor de filtro solar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para matéria-prima e formulações comerciais. Este método possibilita a análise de formulações contendo apenas um filtro solar ou misturas destes, foi validado e apresenta resultados condizentes com o esperado. Através de avaliações estatísticas comprova-se que o método é linear, reprodutível, preciso e exato, podendo-se avaliar formulações de diferentes procedências.

Além disso, utilizou-se a espectrofotometria para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) das formulações, comparando-o com o FPS rotulado.

Palavras-chave: filtros solares, validação, CLAE, FPS *in vitro*, controle de qualidade, formulações cosméticas.

Rio de Janeiro
Junho de 2004

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SUNSCREENS CHEMICALS QUANTIFICATION AND *IN VITRO* SPF DETERMINATION OF COMMERCIAL SUNSCREENS PRODUCTS

Renata Pietsch Ribeiro
Orientador: Sheila Garcia

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sunscreens are substances that absorb or reflect the ultraviolet radiation and these compounds are used in products, considered cosmetics by Brazilian regulations, to prevent or lower the harmful effects of solar radiation on the skin, as erithemas, phototoxic reactions, photoaging and skin cancer. In the last decade, the protection spectrum has been increased by formulations using more than one chemical, to protect skin from UVA and UVB radiation.

This work shows the development and validation of a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) quantification method for sunscreens formulations and sunscreens chemicals. This method has been used to analyze formulations containing just one or several chemicals and has been validated with linear, reproducible, precise and exact results.

Besides, this work has been used the *in vitro* SPF spectrophotometric methodology to compare between the declared and the evaluated SPF of the commercial formulations.

Keywords: sunscreens, validation, HPLC, SPF *in vitro*, quality control, commercial formulations.

Rio de Janeiro
Junho de 2004

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

μL : microlitro

3,4BC: 3-(4-metilbenzilideno) cânfora

a: coeficiente angular da reta

AAG: ácido acético glacial

ANPR: aviso antecipado de proposta de regulamentação

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVO: avobenzona

b: coeficiente linear da reta

BV: balão volumétrico

BZ3: benzofenona-3

C: concentração

Ca: concentração do analito

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMD: concentração média determinada

CME: concentração média experimental

COLIPA: Comité de la Liaison des Associations Europeens de L'Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Associação Européia das Indústrias Cosméticas, de Artigos de Toucador, e Perfumaria)

CT: concentração teórica

DAD: detetor de arranjo de fotodiodos

DME: dose mínima de energia capaz de produzir eritema

DNA: Ácido desoxi ribonucleico

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

EE: efeito eritematogênico

EtOH: etanol

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drug Administration

FPS: fator de proteção solar

h: hora

I: intensidade
IC: intervalo de confiança
ICH: International Conference on Harmonization ou Conferência Internacional de Harmonização
k': fator de capacidade
mcg: micrograma
MCO: p-metoxicinamato de octila
min: minuto
mL: mililitro
MS: Ministério da Saúde
N: número de pratos teóricos
n: número de replicatas
ng: nanograma
nL: nanolitro
nm: nanômetro
°C: graus Celsius
OCT: octocrileno
ODP: octil dimetil PABA
OTC: *over the counter* (ou medicamentos de venda livre)
P.A.: pró-análise
PABA: ácido para-amino benzóico
pH: potencial de hidrogênio iônico
qsp: “quantidade suficiente para”
r: coeficiente de correlação
R: resolução em CLAE
RE: resolução (legislação)
R_f: fator de retenção
SAA: Standards Australia Association (Associação Australiana de Normas)
SO: salicilato de octila
T: fator de cauda ou assimetria
THF: tetraidrofurano
TR: tempo de retenção

UV/Vis: radiações ultravioleta e visível

UV: radiação ultravioleta

UVA: radiação ultravioleta A

UVB: radiação ultravioleta B

UVC: radiação ultravioleta C

λ : comprimento de onda

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1: Representação da determinação do valor do fator de retenção	36
Esquema 2: Esquema do equipamento utilizado	38
Esquema 3: Preparo da solução das amostras	40
Esquema 4: Comportamento e R_f dos filtro solares em CCD	48

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Curva padrão da benzofenona-3	51
Gráfico 2: Curva padrão da avobenzona	51
Gráfico 3: Curva padrão do octocrileno	52
Gráfico 4: Curva padrão do salicilato de octila	52
Gráfico 5: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.1	54
Gráfico 6: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.2	54
Gráfico 7: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.3	54
Gráfico 8: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.1	55
Gráfico 9: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.2	55
Gráfico 10: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.3	55
Gráfico 11: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.1	56
Gráfico 12: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.2	56
Gráfico 13: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.3	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Radiação Solar Não-Ionizante	2
Figura 2: Espectro da Radiação Ultravioleta	3
Figura 3: Estrutura molecular do ácido urocânico	5
Figura 4: Estrutura da pele humana	6
figura 5: Estrutura do ácido p-aminobenzóico (PABA).	8
Figura 6: Ressonância de elétrons no PABA	9
Figura 7: Estrutura geral de salicilatos	9
Figura 8: Estrutura geral dos parabenos	10
Figura 9: Esquema da estrutura molecular dos cinamatos	10
Figura 10: Ressonância de elétrons na estrutura molecular de benzofenonas	11
Figura 11: Ressonância eletrônica ocorrida no metil antranilato	11
Figura 12: Estrutura molecular dos dibenzoilmetanos	12
Figura 13: Estrutura molecular dos derivados da cânfora utilizados como filtro solar	12
Figura 14: Estrutura molecular do ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico	12
Figura 15: Estrutura molecular do filtro solar benzofenona-3	32
Figura 16: Estrutura molecular do octil dimetil PABA	32
Figura 17: Estrutura molecular do filtro solar <i>para</i> -metoxicinamato de octila	33
Figura 18: Estrutura molecular do filtro solar salicilato de octila	33
Figura 19: Estrutura molecular do filtro solar octocrileno	33
Figura 20: Estrutura molecular do butil metoxidibenzoil metano (ou avobenzona)	33
Figura 21: Estrutura da imiduréia	42
Figura 22: Estrutura do BHT	42
Figura 23: Pico cromatográfico assimétrico	50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Filtros solares e algumas de suas propriedades	19
Tabela 2: Formulações analisadas	34
Tabela 3: Condições cromatográficas	37
Tabela 4: Concentração dos padrões das curvas de calibração	39
Tabela 5: Formulações 1.1, 1.2 e 1.3 para validação do método I	41
Tabela 6: Formulações 2.1, 2.2 e 2.3 para validação do método I	43
Tabela 7: Formulações 3.1, 3.2 e 3.3 para validação do método II	43
Tabela 8: Condições cromatográficas	49
Tabela 9: Comprimentos de onda de quantificação	51
Tabela 10: Formulações para recuperação	53
Tabela 11: Resultados das formulações “A” e “B”.	57
Tabela 12: Resultados das formulações “C”, “D”, “E”, “F”, “G” e “H”.	58
Tabela 13: Resultados das formulações “I”, “J” e “L”.	59
Tabela 14: FPS das formulações analisadas	60
Tabela 15: Cálculo teórico do FPS das formulações “B”, “E”, “G”, “H” e “I”	61

LISTA DE FÓRMULAS

	Página
Fórmula 1: Fator de Proteção solar	14
Fórmula 2: Cálculo do FPS segundo Mansur	17
Fórmula 3: Desvio padrão relativo (DPR)	28
Fórmula 4: Exatidão de um método analítico.	29

Fórmula 5: Cálculo do fator de retenção 36

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Expressões orientativas para rotulagem de protetores solares	16
Quadro 2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda	18
Quadro 3: Classificação dos testes, segundo sua finalidade	23
Quadro 4: Características de Validação recomendadas dos vários tipos de testes	23

SUMÁRIO

	página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Radiação ultravioleta	2
2.2 Sistemas naturais de proteção à radiação UV	5
2.3 Os protetores solares	7
2.3.1 Relação estrutura-atividade dos protetores solares	8
2.4 Eficácia dos filtros solares e fator de proteção solar	13
2.4.1 Métodos para determinação do FPS	15
2.4.1.1 Metodologias de determinação do FPS segundo a ANVISA	15
2.4.1.2 Metodologias <i>in vitro</i> de determinação do FPS	17
2.5 Determinação do teor de filtros solares	20
2.6 Validação de métodos analíticos	22
2.6.1 Especificidade	24
2.6.2 Linearidade	25
2.6.3 Intervalo de confiança	26
2.6.4 Precisão	26
2.6.5 Exatidão	28
2.6.6 Robustez	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	31
4.1.1 Equipamentos	31
4.1.2 Reagentes	31
4.1.3 Padrões de filtros solares	31
4.1.4 Produtos analisados	32
4.2 Métodos	35
4.2.1 Avaliação da separação cromatográfica	35
4.2.2 Análise do teor de filtros solares	37
4.2.2.1 Preparo da solução padrão	38

4.2.2.2	Construção da curva padrão	39
4.2.2.3	Preparo da solução da amostra	39
4.2.2.4	Quantificação da amostra	40
4.2.3	Validação do método	40
4.2.3.1	Formulações para a validação dos métodos	41
4.2.4	Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)	44
4.2.4.1	Preparo da solução	44
4.2.4.2	Análise no espectrofotômetro	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Avaliação da separação cromatográfica por CCD	46
5.2	Parâmetros cromatográficos	49
5.3	Determinação do teor de filtro solar	51
5.3.1	Comprimentos de onda de quantificação	51
5.3.2	Curva de calibração	51
5.3.3	Validação do método	52
5.3.4	Formulações comerciais	57
5.4	Determinação do FPS das formulações	60
6	CONCLUSÕES	62
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9	APÊNDICE	73
9.1	Gráfico 3D benzofenona-3 (BZ3)	74
9.2	Gráfico 3D avobenzona (AVO)	75
9.3	Gráfico 3D octocrileno (OCT)	76
9.4	Gráfico 3D salicilato de octila (SO)	77
9.5	Gráfico 3D p-metoxicinamato de octila (MCO)	78
9.6	Gráfico 3D octil dimetil PABA (ODP)	79
9.7	Cromatogramas da mistura dos filtros solares BZ3, AVO, OCT e SO pelo método I	80
9.8	Cromatogramas da mistura dos filtros solares BZ3 e MCO pelo método I	82
9.9	Cromatogramas da mistura dos filtros solares BZ3, ODP e MCO	

	pelo método II	83
9.10	Cálculo teórico do FPS de formulações	84
10	ANEXOS – TRABALHOS EM CONGRESSOS	86
10.1	Certificado do 3º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Rio de Janeiro	87
10.1.1	Resumo do trabalho apresentado (Anais)	88
10.2	Certificado do VII Pharmatech / IV Enecq	89
10.2.1	Resumo do trabalho apresentado (Anais)	90
10.3	Certificado do 18º Congresso Brasileiro de Cosmetologia	91
10.3.1	Trabalho apresentado (trabalho completo – Anais)	92

1 Introdução

Os filtros solares são substâncias usualmente utilizadas em produtos cosméticos para proteger a pele contra a radiação ultravioleta solar. Eles são capazes de diminuir a quantidade de radiação UV que atinge a pele humana por absorção e/ou reflexão desta radiação (PERUGINI et al., 2002).

Este projeto de pesquisa propõe-se a desenvolver uma avaliação de produtos comerciais de diferentes procedências utilizados como protetores solares, no que se refere ao valor de FPS (fator de proteção solar) e teor de filtro solar contido em cada formulação. Para isso, utiliza uma metodologia de cálculo de FPS por espectrofotometria desenvolvida anteriormente, e descreve o desenvolvimento e a validação de uma metodologia de quantificação dos filtros solares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação eletromagnética emitida pelo sol mostra um largo espectro de comprimentos de onda e é uma fonte de energia natural que possui um grande potencial de utilização devido à sua abundância e acessibilidade. Pode ser dividida em duas maiores regiões de acordo com a capacidade de ionização atômica: radiação ionizante e radiação não-ionizante. A radiação ionizante, por sua vez, é subdividida em raios-X e raios gama, enquanto a radiação não-ionizante (Figura 1) subdivide-se em radiação ultravioleta, luz visível e radiação infravermelha. Felizmente a radiação ionizante altamente prejudicial não penetra na atmosfera terrestre (KIRCHOFF, 1995).

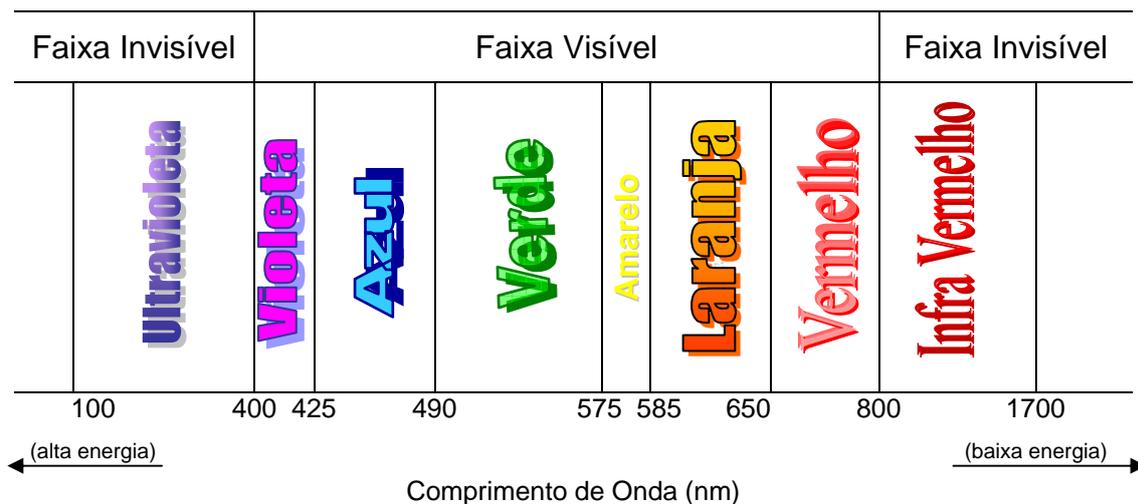


Figura 1: Radiação Solar Não-Ionizante.

Todo esse espectro de radiação é comumente classificado de acordo com seu comprimento de onda (λ). A radiação UV (Figura 2) é a parte do espectro eletromagnético entre 100 e 400nm. E é, por sua vez, subdividida arbitrariamente em outros componentes de acordo com efeitos biológicos: UVA (bronzante), UVB (eritematosa) e UVC (germicida). Os efeitos adversos dos raios UV no homem incluem queimadura solar (eritema), conjuntivite, câncer de pele, envelhecimento precoce, entre outros. Em contraste,

o fenômeno vital da fotossíntese é um exemplo do efeito benéfico da luz solar no meio ambiente.

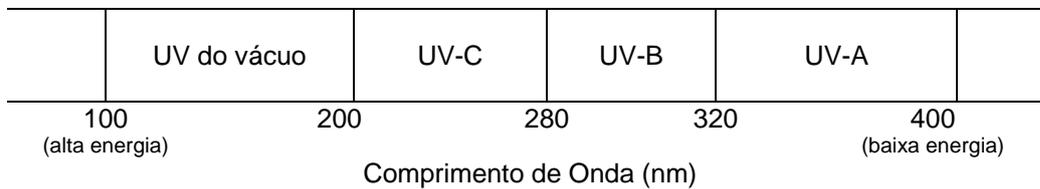


Figura 2: Espectro da Radiação Ultravioleta.

Contudo, a radiação solar é atenuada ao atravessar as camadas atmosféricas, não permitindo que uma parte substancial atinja a superfície terrestre. Esse fenômeno deve-se à absorção, dispersão e reflexão na estratosfera (camada mais externa), com sua fina camada de ozônio, e troposfera, onde se formam as nuvens e as manifestações climáticas (EPSTEIN, 1997; ROY *et al*, 1998).

Mesmo sendo um pré-requisito para a vida, a luz do sol pode ser extremamente nociva à saúde humana. Apesar de não penetrar profundamente no organismo, ela atinge as partes externas do corpo (pele, olhos e mucosas) e uma exposição excessiva ao sol está associada com o aumento nos riscos de câncer de pele, fotoenvelhecimento, cataratas e outras doenças oftalmológicas. Pode também afetar o sistema imune, comprometendo a eficácia dos programas de vacinação, por exemplo. (MURPHY, 2002; SLINEY, 2001; CLYDESDALE *et al*, 2001; GRUIJL, 2001; BRIDGES, 1998; NORVAL, 2001)

Essa exposição excessiva resulta em severo estresse oxidativo nas células da pele por: (a) interações com cromóforos intracelulares e fotosensibilizadores, resultando em danos genéticos transitórios e permanentes; e (b) pela ativação de sinalizadores citoplasmáticos de vias de transdução de sinais relacionadas com o crescimento, a diferenciação, o envelhecimento e a degradação do tecido conectivo. O fotoenvelhecimento da pele é um processo biológico complexo que afeta várias camadas da pele, sendo que o maior dano é observado no tecido conectivo da derme (WLASCHECK *et al.*, 2001). As pessoas ficam com a aparência mais velha, quando a pele perde a firmeza e tonicidade, aparecendo rugas. (LEYDEN, 2001, GIES *et al*, 1998; MURPHY, 2002)

A incidência do câncer de pele aumenta a cada ano e há evidências que os três principais tipos (carcinoma da célula basal, carcinoma da célula escamosa e o melanoma cutâneo maligno) são causados pela exposição solar (muitas vezes, à exposição recreativa que leva às queimaduras, eritemas). Os raios UV são capazes de danificar o DNA celular diretamente, causando mutações nos genes, possibilitando o desenvolvimento do câncer. É observada uma relação epidemiológica entre o aparecimento da doença com alguns parâmetros como latitude, resistência pessoal e efeito da migração, origem étnica, coloração da pele não exposta, propensão à queimadura e habilidade de bronzeamento, frequência de exposição etc., além de comprovações da mutação genética característica causada pelos raios UVB nos melanomas. Há também uma evidência que o risco ao melanoma esteja relacionado à exposição intermitente ao UV especialmente na infância (ARMSTRONG & KRICKER, 2001; MURPHY, 2002; BRIDGES, 1998; BERG, 2004).

A exposição do olho humano ao UV depende de muitos fatores: reflexão causada pela superfície, claridade do céu, reflexão atmosférica, e o não uso de óculos protetores. Os efeitos agudos dessa incidência incluem o desenvolvimento de fotoqueratite, fotoconjuntivite, que é parecido com uma queimadura solar nos tecidos mais delicados da pele, causada na córnea e na pálpebra. Apesar de doloroso, esse processo é reversível e facilmente prevenido com o uso de óculos escuros. Os efeitos crônicos incluem a possibilidade do desenvolvimento de câncer no tecido conjuntivo e catarata. (WHO/OMS, 1999; SLINEY & LEARY, 1992; CLYDESDALE *et al*, 2001).

Para o sistema imunológico, os raios UV podem ser nocivos por modificar a atividade e distribuição das células responsáveis para o disparo da resposta imune. A radiação ultravioleta gera uma resposta negativa (downregulation) da imunidade que acaba por gerar uma falha na resposta imune do indivíduo. (WHO/OMS, 1999; NORVAL, 2001; CLYDESDALE *et al*, 2001; MOYAL *et al*, 1997)

2.2 SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV

A pele constitui uma considerável proteção para a penetração dos raios ultravioleta. Os sistemas naturais que previnem os danos solares são formados pela secreção sudorípara, pigmentação (melanina) e pela camada córnea. (BARTH, 2000; LÉPORI, 2002)

Na secreção sudorípara existe um componente, o ácido urocânico (ácido 4-imidazoilacrílico) (Figura 3), cujas propriedades absorventes se situam na faixa das radiações UVB, com o máximo de absorção em 277nm.

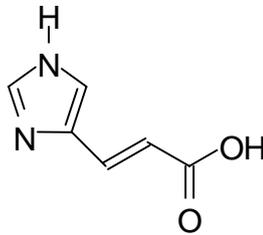


Figura 3: Estrutura molecular do ácido urocânico.

A melanina (eumelanina) é o pigmento biológico presente na pele, cabelos e olhos. Sua absorção ocorre numa extensa faixa de comprimentos de onda, desde o ultravioleta até as regiões próximas do infravermelho. Ela é bioquimicamente um radical livre sem reação, neutraliza e separa radicais livres na pele e é finalmente desprendido com o estrato córneo. Apresenta sinergia com outros antioxidantes como o tocoferol. A concentração de melanina na pele reduz a alvura. (CHEDEKEL, 1998) Nas células observa-se que o pigmento tende a cobrir a parte superior do núcleo para proteger o DNA celular do dano que possa ser ocasionado pela radiação UV (LÉPORI, 2002).

A camada córnea (ou estrato córneo) é formada pela sobreposição de células queratinizadas e anucleadas, e é a camada mais superficial da epiderme. Ela funciona como uma barreira à perda de água do organismo para o meio ambiente e contra a penetração de produtos do meio ambiente (Figura 4). Entre 5% e 10% da luz que incide é refletida pelo estrato córneo. A pele onde se tem este estrato fino é muito mais sensível à radiação UV e pode ser queimada ou lesionada com mais facilidade do que aquela dotada de uma abundante camada córnea (LÉPORI, 2002).

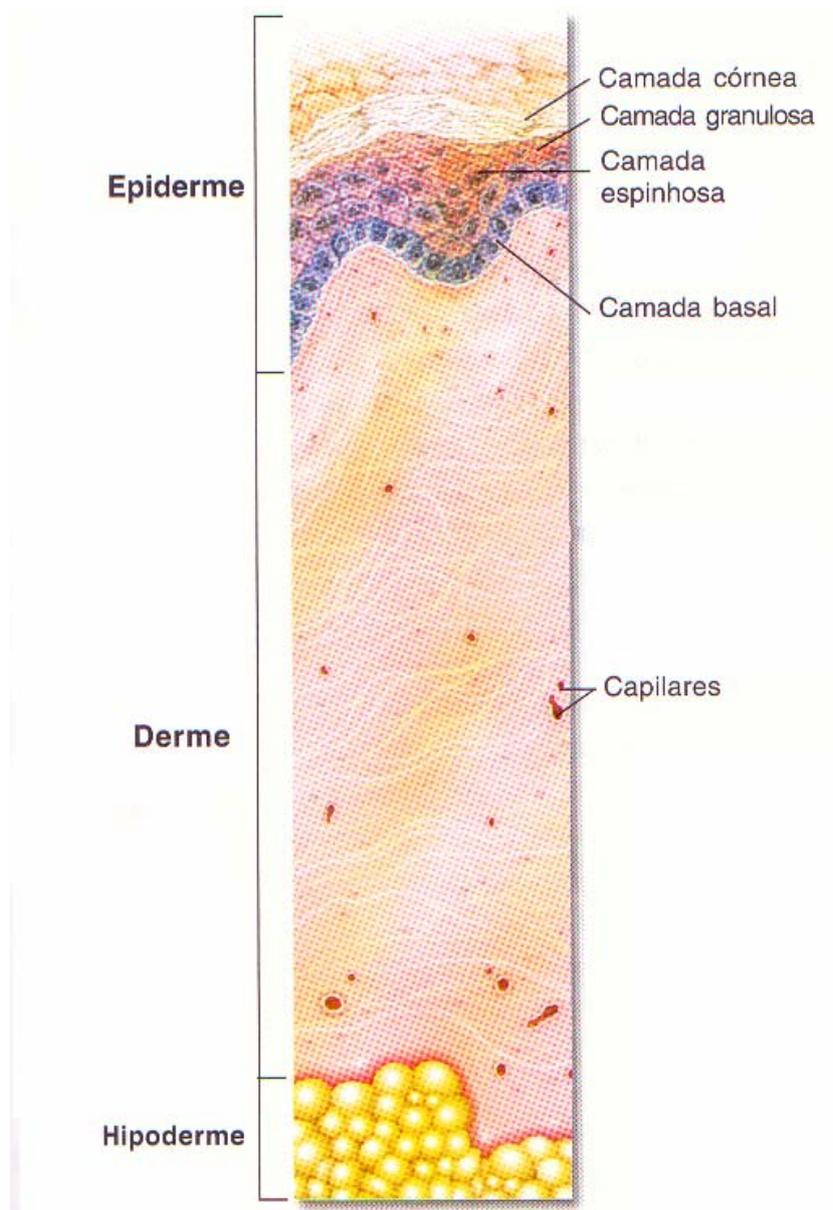


Figura 4: Estrutura da pele humana (LÉPORI, 2002)

2.3 OS PROTETORES SOLARES

Os protetores solares surgiram quando se observou que existiam substâncias capazes de prevenir a queimadura da pele (eritema) pelos raios solares. No início do século era observado que sulfato de quinina acidificado e, mais tarde, o Antilux (2-naftol-6,8-dissulfonato de sódio) evitavam as queimaduras (URBACH, 2001). Ao longo do século XX, muitas substâncias surgiram com eficácia na prevenção de eritema solar e seu uso se tornou mais popular após a Segunda Guerra Mundial, com o ácido *p*-amino benzóico (PABA). (SHAATH, 1997)

Os filtros solares, como mencionado anteriormente, são substâncias capazes de absorver a energia eletromagnética na faixa denominada ultravioleta e emití-la sob outra forma (geralmente na faixa do infravermelho, gerando sensação de calor). Com isto, não ocorre a penetração da radiação na pele, evitando-se os danos.

Permite-se, assim, maior tempo de exposição ao sol e, recentemente, estão sendo utilizados ainda mais devido à necessidade de prevenção contra as reações fototóxicas, o câncer de pele e o envelhecimento precoce da pele (OZER et al., 2001; UITTO et al., 1997). A eficácia dos filtros solares é dependente da sua capacidade de absorção da energia radiante, que é proporcional à sua concentração, intervalo de absorção e comprimento de onda onde ocorre absorção máxima. A associação de diferentes filtros em formulações também é um recurso para eficácia (DE PAOLA & RIBEIRO, 1998)

Além do uso contínuo de protetores solares, alguns autores defendem ainda que é imprescindível a conscientização dos efeitos danosos da radiação UV para que outros hábitos sejam adotados, como uso de óculos, roupas apropriadas e menor tempo de exposição. (DIFFEY, 2001a)

2.3.1 Relação estrutura-atividade dos protetores solares:

Os protetores solares podem agir de duas maneiras: absorvendo a radiação incidente ou refletindo-a. As substâncias que refletem a radiação são denominadas protetores físicos, pois são como uma barreira física que não permite a passagem da radiação (exemplo: dióxido de titânio e óxido de zinco). Os protetores químicos são aqueles que possuem como característica a absorção de um ou mais comprimentos de onda específicos, transformando-o em outro tipo de energia. Esses filtros UV podem ser classificados como: (SHAATH, 1997).

- Derivados do PABA (ou p-aminobenzoatos);
- Salicilatos;
- Cinamatos;
- Benzofenonas;
- Antranilatos;
- Dibenzoilmetanos;
- Derivados da cânfora;
- Diversos.

O ácido p-aminobenzóico (PABA), foi o primeiro filtro ultravioleta patentado e foi imensamente utilizado nas décadas de 50 e 60. Ele possui uma absorção máxima em 296nm. Sua estrutura química (Figura 5) mostra a presença de dois grupos funcionais reativos substituindo com orientação *para* no núcleo benzênico. (SHAATH, 1997)

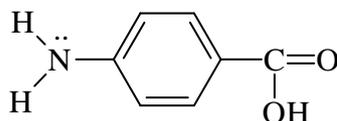


Figura 5: Ácido p-aminobenzóico (PABA).

Essa configuração de um grupamento doador de elétrons ($-NH_2$) *para* em relação a um grupo aceptor de elétrons ($-COOH$) permite uma migração de elétrons como mostrado na Figura 6:

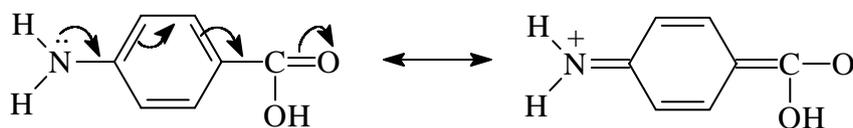


Figura 6: Ressonância de elétrons no PABA.

Cálculos de química quântica revelaram que essa energia de deslocalização dos elétrons corresponde a transições eletrônicas associadas com a região UVB do espectro solar.

Os salicilatos como o salicilato de benzila, de octila, de homomentila, de trietanolamina, entre outros, são compostos orto-disubstituídos, com um arranjo espacial que permite uma ligação de hidrogênio interna na molécula (Figura 7), absorvendo a radiação UV em torno de 300nm.

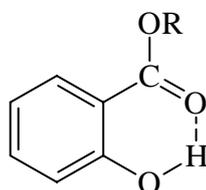


Figura 7: Estrutura geral de salicilatos.

A ligação de hidrogênio intramolecular evidenciada na figura 7, diminui a energia necessária para promover o composto ao seu estado excitado. Com isso, a molécula absorve radiação por volta de 300nm e não por volta de 270nm como era de se esperar se os salicilatos fossem comparados com parabenos, que são moléculas semelhantes. Os parabenos não possuem a ligação de hidrogênio intramolecular como os salicilatos, pois seu padrão de substituição no anel é *para* (Figura 8), e a energia absorvida é em torno de 270nm.

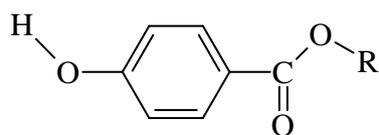


Figura 8: Estrutura geral dos parabenos.

Os salicilatos possuem excelente segurança e estabilidade, justificados por este padrão de substituição em *orto*, que faz com que os dois grupos funcionais ativos fiquem ligados entre si por uma ligação intramolecular. Além disso, os elétrons de suas estruturas estão menos disponíveis para interações com outros componentes ou substratos biológicos da pele. Similarmente, numa formulação estes compostos estão menos susceptíveis a efeito dos solventes e seu comportamento em todos os meios (polar e apolar) é estável e conseqüentemente, previsível.

Da classe dos cinamatos, o benzilcinamato, apesar de não ser mais utilizado hoje em dia, foi uma das primeiras substâncias utilizadas para proteção solar, utilizada em combinação com o salicilato de benzila. Hoje essa classe, principalmente o *p*-metoxicinamato de octila, é uma das mais utilizadas na proteção da porção UVB do espectro eletromagnético (SHAATH, 1997).

Na estrutura molecular dos cinamatos há uma insaturação extra, conjugada com o anel aromático e o grupamento carbonila que permite um deslocamento eletrônico (Figura 9). A energia capaz de gerar essa transição eletrônica corresponde ao comprimento de onda nas proximidades de 305nm.

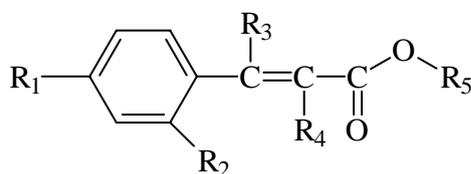


Figura 9: Esquema da estrutura molecular dos cinamatos.

Os benzofenonas são a única classe de filtros solar que pertencem à categoria das cetonas aromáticas. A deslocalização por ressonância, como nas outras classes de compostos, é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições

orto e/ou *para*. O grupamento carbonila participa deste processo sendo o grupamento elétron receptor (Figura 10).

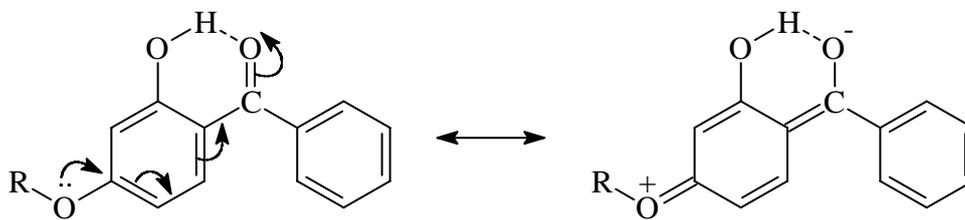


Figura 10: Ressonância de elétrons na estrutura molecular de benzofenonas.

Esses compostos fazem ressonância mais facilmente, requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica. E, como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ($E = hc/\lambda$), os compostos desta classe absorverão a energia com valores correspondentes de comprimento de onda acima de 320nm (SKOOG & LEARY, 1992).

Os antranilatos são outra classe de compostos que absorvem energia na faixa ultravioleta do espectro eletromagnético. Estes compostos possuem o “efeito orto” que facilita a deslocalização do elétron, permitindo uma transição de baixa energia, a 336nm para o metil antranilato (Figura 11) (SHAATH, 1997).

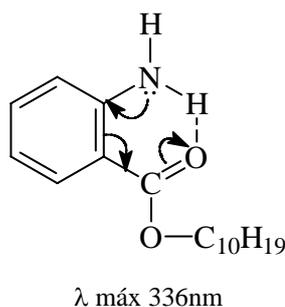


Figura 11: Ressonância eletrônica ocorrida no metil antranilato.

Dibenzoilmetanos ou dicetonas substituídas (Figura 12) são uma classe relativamente nova de filtros UV. Esses compostos exibem propriedades resultantes de tautomerismo ceto-enólico. Em configuração cetona, a absorção máxima se dá em torno de 260nm. Entretanto, na forma enólica se observa valores além de 345nm, tornando os compostos bons candidatos a filtros UVA (SHAATH, 1997).

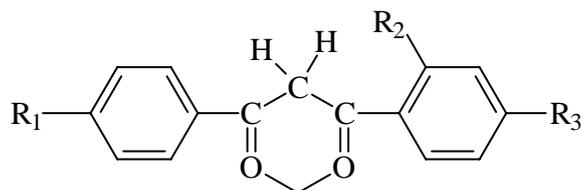


Figura 12: Estrutura molecular dos dibenzoilmetanos.

Os derivados da cânfora são compostos bicíclicos que absorvem na faixa da radiação UVB, de 290 a 300nm. A grande absorptividade é devida a deslocalização eletrônica da ressonância (Figura 13) (SHAATH, 1997).

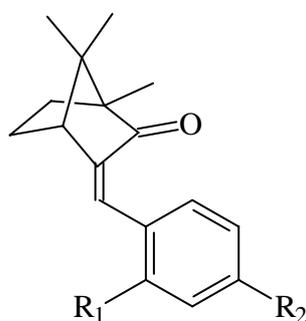


Figura 13: Estrutura molecular dos derivados da cânfora utilizados como filtro solar.

Há ainda alguns compostos utilizados como filtro solar que não fazem parte das classes descritas anteriormente, como o ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico (Figura 14), um filtro bastante utilizado no Brasil e em outros países, como Estados Unidos e países europeus (SHAATH, 1997); também como os extratos vegetais (GARCIA *et al*, 1995).

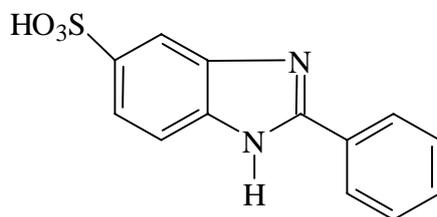


Figura 14: Estrutura molecular do ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico.

2.4 EFICÁCIA DOS FILTROS SOLARES E FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

A crescente preocupação com os efeitos deletérios da exposição à radiação levou ao desenvolvimento de preparações tópicas que se utilizam de uma combinação de filtros que protegem em toda a faixa do ultravioleta. Quando se utiliza uma combinação de filtros UVA e UVB, permite-se uma proteção de amplo espectro à pele e, se os filtros solares forem também fotoestáveis, poder-se-á permitir uma proteção de longa duração (OZER et al., 2001; NOHYNEK & SCHAEFER, 2000; MAIER et al, 2001).

Além de absorver a radiação ultravioleta incidente, um produto para proteção solar deve ainda ser estável na pele humana e ao calor, e ser fotoestável sob a luz do sol para permitir proteção durante várias horas, evitando contato com produtos de degradação. Paralelamente, os filtros solares ainda não devem ser irritantes, sensibilizantes ou fototóxicos. Eles devem recobrir e proteger a superfície da pele, mas não devem penetrá-la, para que não se tenha uma exposição sistêmica a essas substâncias. Os filtros solares não devem ser tóxicos, já que são absorvidos traços deste através da pele ou ingeridos após a aplicação nos lábios. Finalmente, um bom protetor solar deve ser resistente à água, insípido, inodoro e incolor, e deve ser compatível com formulações cosméticas (MARTI-MESTRES *et al*, 1997; NOHYNEK & SCHAEFER, 2000; JOHNCOCK, 2000).

A reaplicação do protetor solar na pele também é um evento que deve ser considerado. Dependendo da quantidade aplicada e do tempo de reaplicação da formulação a proteção da pele pode ser alterada (DIFFEY, 2001b). O uso freqüente de protetores solares, principalmente os de amplo espectro que protegem contra as radiações UVA e UVB, mostra-se eficaz na prevenção de carcinomas. Porém, usuários de filtros solares que não tomam nenhuma outra medida de prevenção aos raios UV, podem aumentar o risco de melanoma por aumentarem o tempo de exposição ao sol (BERG, 2004).

A determinação do FPS é uma técnica que comprova a eficácia dos filtros solares para a porção UVB do espectro eletromagnético. Como o UVB é o responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele que é capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar. O FPS é uma razão entre o tempo de exposição à radiação

ultravioleta necessário para produzir eritema na pele protegida pelo protetor solar e para a pele desprotegida (Fórmula 1) (RUVOLO JÚNIOR, 1997; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME na pele protegida}}{\text{DME na pele desprotegida}}$$

Fórmula 1: Fator de Proteção solar

onde DME é a dose mínima de radiação capaz de produzir um eritema mínimo, expressa em KJ/min.

A metodologia apropriada para se determinar a eficácia de produtos antisolares expressa como um número de FPS é uma questão industrial internacional. Há a necessidade de um meio de comparação pelo consumidor, já que muitos produtos atuam no mercado do mundo inteiro como concorrentes (JANOUSEK, 1997).

Existem substâncias que, embora destituídas de efeito fotoprotetor intrínseco, determinam o aumento da performance das formulações contendo filtros solares. Estas substâncias desempenham diversos papéis na formulação, como por exemplo, a de agentes formadores de filmes (filmógenos), capazes de torná-las altamente resistentes à lavagem com água pois são insolúveis em água, possuindo baixa tensão superficial, conferindo as propriedades de formador de filme. Os agentes de emoliência também podem contribuir com o aumento da eficácia da formulação fotoprotetora por aumentarem sua lipofilicidade, determinando uma melhor deposição dos filtros solares na pele e conferindo uma maior resistência à água (AZZELLINI, 1995). Substâncias que previnem reação inflamatória ocasionada pela radiação UVB também são propostas para a melhoria da eficácia dos protetores solares (COHEN et al, 1994).

No Brasil os protetores solares são considerados cosméticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002), diferentemente dos Estados Unidos da América, onde o FDA (Food and Drug Administration) considera esses produtos como “OTC” (over the counter, uma denominação utilizada para medicamentos de venda livre) desde 25 de agosto de 1978, quando publicou no Federal Register um aviso antecipado de proposta de regulamentação (ANPR) quando utilizados em seres humanos (RUVOLO

JÚNIOR, 1997), já que são considerados como produtos para prevenção de efeitos agudos (como o eritema solar) e crônicos (como o câncer de pele) causados pela radiação solar.(FDA, 1999).

2.4.1 Métodos para determinação do FPS

Para a determinação do FPS de formulações, existem basicamente três tipos de metodologias preconizadas: a do FDA, utilizada nos EUA; a da COLIPA, utilizada nos países Europeus; e a da SAA, norma australiana utilizada na Austrália e Nova Zelândia (RUVOLO JÚNIOR, 1997). Estes métodos se utilizam de indivíduos para determinar o FPS e por isso são contestados por alguns autores.

A determinação do FPS de formulações é feita por métodos *in vivo*, utilizando 20 indivíduos sadios, sendo homens e mulheres com sensibilidade mediana ao UV. Numa parte das costas de cada indivíduo (0,3m x 0,3m), aplica-se o produto ($150 \pm 15\text{mg}/100\text{cm}^2$) em 4 cm^2 , deixando também uma parte descoberta (superfície teste), separada por uma fita de 1cm de largura. Irradia-se com lâmpada UV de 300w vinte minutos após a aplicação do produto. Observa-se o tempo de formação do eritema e obtém-se o FPS após a realização dos cálculos (JANOUSEK, 1997). O padrão utilizado pelo FDA é uma formulação contendo 8% de salicilato de homomentila, que confere um FPS de 4,47 a esta formulação e, para o COLIPA a fórmula padrão contém 2,7% de p-metoxicinamato de octila (FPS $3,7 \pm 0,3$).

2.4.1.1 Metodologias de determinação do FPS segundo a ANVISA: (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002)

Este órgão não desenvolve nenhuma metodologia específica, mas determina que sejam utilizadas estritamente a metodologia de determinação do fator de proteção solar indicada pelo FDA, de maio de 1993, ou a norma COLIPA, de outubro de 1994.

Assim como para o FPS, não foi desenvolvida nenhuma metodologia para a determinação de “**resistente a água**” ou “**muito resistente a água**”, mas sim uma orientação para se seguir a metodologia do FDA.

Para a quantificação da proteção UVA, não se tem nenhuma recomendação estabelecida, mas uma determinação de que qualquer metodologia pode ser seguida se estiver devidamente validada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

◆ Rotulagem

Estabeleceu-se que seria obrigatório a indicação do número de proteção solar precedido pela sigla “**FPS**” ou “**SPF**” ou das palavras “**Fator de Proteção Solar**”. Além disso, no verso da embalagem estabeleceu-se conter expressões orientativas como as do quadro 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002):

Quadro 1: Expressões orientativas para rotulagem de protetores solares.

Baixa: (FPS: $\geq 2 < 6$)	Pele pouco sensível	“Oferece baixa proteção contra queimaduras solares”
Moderada: (FPS: $\geq 6 < 12$)	Pele sensível	“Oferece moderada proteção contra queimaduras solares”
Alta: (FPS: $\geq 12 < 20$)	Pele muito sensível	“Oferece alta proteção contra queimaduras solares”
Muito Alta: (FPS: ≥ 20)	Pele extremamente sensível	“Oferece muito alta proteção contra queimaduras solares”

(adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002)

Além dessa orientação, outras foram determinadas a conter no rótulo de produtos fotoprotetores, como: “**É necessária a reaplicação do produto para manter sua efetividade**”, “**ajuda a prevenir as queimaduras solares**”, “**para crianças menores de (6) seis meses, consultar um médico**”, “**este produto não oferece nenhuma proteção contra insolação**”, “**evitar exposição prolongada das crianças ao sol**”, “**aplique**

generosamente ou livremente antes da exposição ao sol e sempre que necessário”, incluindo tempo, determinado pelo fabricante, caso seja requerido período de espera para exercer a ação ou proteção.

Para produtos que adequadamente comprovem a resistência a água, esta informação deve estar contida no rótulo também. Além disso, deve conter informações sobre o tempo máximo para a reaplicação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

2.4.1.2 Metodologias *in vitro* de determinação do FPS

Também estão descritos na literatura científica métodos *in vitro* (MANSUR *et al.*, 1986; DIFFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999) que têm como vantagem a segurança de não ser preciso a utilização de voluntários humanos para a determinação do FPS. É empregada a espectrofotometria na região do UV para a avaliação das formulações.

O método desenvolvido por Mansur e colaboradores (MANSUR *et al.*, 1986) demonstrou ser eficaz e rápido, além de apresentarem uma boa correlação com os resultados *in vivo*, já tendo sido utilizado em outros trabalhos (BARTH, 2000; SANTOS *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 1990). Mede-se a absorvância de uma solução da formulação em vários comprimentos de onda (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320nm) e aplica-os na fórmula 2 apresentada a seguir:

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

Fórmula 2: Cálculo do FPS segundo Mansur (MANSUR, 1986).

FC = fator de correção (igual a 10)

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

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

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

Quadro 2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda: (MANSUR, 1986)

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

O método desenvolvido por Diffey (DIFFEY, 1997) calcula o FPS utilizando um espectrofotômetro de reflectância. A principal vantagem deste método é poder determinar o FPS de formulações contendo bloqueadores solares (filtros solares físicos, como o dióxido de titânio, por exemplo).

◆ FILTROS SOLARES COMERCIAIS

Na tabela 1 estão relacionadas as nomenclaturas, os nomes comerciais e algumas das propriedades desses filtros solares, como a faixa de comprimentos de onda no(s) qual (quais) absorve e o comprimento de onda de maior absorção de cada substância, adaptado de ENCICLOPÉDIA, 1995.

Tabela 1: Filtros solares e algumas de suas propriedades.

Filtro Solar	Sinônimos	Nomes Comerciais	Absorção UV	λ máximo (nm)*
Benzofenona-3	Oxibenzona	Uvinul M-40®	UVA UVB	288/325
		Eusolex 4360®		
		Neo-Heliopan BB®		
		Escalol 567®		
Butil metóxi dibenzoil metano	Avobenzona	Parsol 1789® Eusolex 9020®	UVA	358
3-(4-metil benzilideno) cânfora	3-(4'-metil benzilideno) cânfora	Eusolex 6300® Parsol 5000® Neo Heliopan MBC®	UVB	300
Octocrileno	2-ciano-3,3-difenil-acrilato de 2 etil-hexila	Neo Heliopan 303® Uvinul N-539® Escalol 597®	UVB	303
Octil Dimetil PABA	Padimato O; p-aminobenzoato de octil-dimetila	Eusolex 6007® Escalol 507®	UVB	311
p-metoxicinamato de octila	p-metoxicinamato de 2-etil-hexila	Escalol 557® Parsol MCX® Neo-Heliopan AV® Uvinul MC-80®	UVA UVB	311
Salicilato de Octila	Salicilato de 2-etil-hexila	Uvinul O-18® Neo Heliopan OS® Escalol 587®	UVB	307

* em etanol.

2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FILTROS SOLARES

Para determinar a quantidade de uma substância numa formulação ou para se determinar o teor de uma matéria prima, deve-se fazer seu “**ensaio de teor**” que é a determinação quantitativa da substância presente numa amostra, isto é, sua quantificação.

A quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido adotada para diversas análises por ser uma metodologia bastante versátil e prática pois pode ser totalmente automatizada. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (GUIMARÃES *et al.*, 1997). Além disso, existem ensaios descritos por CLAE com a separação e determinação de filtros solares (VANQUERP *et al.*, 1999; IKEDA *et al.*, 1989; GAGLIARDI *et al.*, 1989; RASTOGI *et al.*, 1998; SALVADOR *et al.*, 2003; CHISVERT & SALVADOR, 2002; DINUNZIO & GADDE, 1990; SCALIA, 2000; SMYRNIOTAKIS & ARCHONTAKI, 2003).

Propriedades como massa molecular, solubilidade, estrutura e pKa devem ser consideradas ao se escolher a melhor condição cromatográfica para a separação dos componentes de uma determinada amostra. (GUIMARÃES, 1997)

Em relação à fase móvel, esta deve ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação, dissolver a amostra sem decompor seus componentes, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade, ser compatível com o tipo de detetor utilizado, ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (GUIMARÃES, 1997).

Há cinco tipos diferentes de CLAE: por adsorção, por partição, com fase ligada (podendo ser fase normal ou fase reversa), por exclusão, e por troca iônica. Essa diferença é determinada pelo tipo de fase estacionária utilizada. A cromatografia por adsorção se baseia na competição que existe entre as moléculas da amostra e as da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária. A cromatografia por partição,

também chamada de líquido-líquido, utiliza uma fase estacionária de água em sílica e a fase móvel orgânica. Seu mecanismo de separação baseia-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Os componentes mais solúveis na fase estacionária serão seletivamente retidos, enquanto os menos solúveis serão transportados mais rapidamente pela fase móvel (GUIMARÃES, 1997).

A cromatografia líquida com fase ligada também baseia-se no mecanismo de partição como a anterior, só que possui a fase estacionária quimicamente ligada ao suporte, o que a torna mais estável. Variando-se a natureza dos grupos funcionais ligados ao suporte da coluna, pode-se obter diferentes tipos de seletividade, que podem ter natureza polar (fase normal) ou apolar (fase reversa).

A cromatografia por exclusão efetua a separação de acordo com o tamanho das moléculas. O tamanho dos poros da coluna é controlado a fim de que se tenha as moléculas pequenas (de baixo peso molecular) percorrendo um trajeto maior e apresentando um maior tempo de retenção, e as moléculas maiores não penetram em todos os poros e são eluídas mais rapidamente.

A cromatografia por troca iônica possui uma resina com uma molécula iônica ligada. À esta, ligam-se contra-íons que são moléculas de carga oposta. Estes, por sua vez, podem ser deslocados pelos íons da fase móvel de carga similar a ele. Ocorre, então, um equilíbrio entre a ligação nos sítios da fase estacionária com o contra-íon e com o íon da amostra (GUIMARÃES, 1997).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). A validação de um método analítico objetiva a produção de resultados com Confiabilidade Analítica estando, o laboratório e o método escolhido ou desenvolvido, voltados para tal (LEITE, 2002).

O ICH (International Conference on Harmonization) é uma organização que define parâmetros para a harmonização das técnicas de validação de metodologias internacionalmente (ERMER, 2001).

Desde 1999, através da resolução 391 de 9 de agosto de 1999, já era dada a devida importância à validação por normatizar, disciplinar e regulamentar critérios para registro de medicamentos genéricos no Ministério da Saúde, qualificando a validação de métodos analíticos como um dos pré-requisitos para o registro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999). Desde então, foram emitidas e revogadas várias legislações complementando e aprofundando as anteriores. A legislação em vigor é a resolução RE no. 899 de 29 de maio de 2003 na qual se estabelece a definição dos parâmetros para a validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade (ou limite de detecção), limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (SHABIR, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Essas características da validação que são geralmente exigidas variam de acordo com a finalidade do teste, que estão classificadas no quadro 3.

Quadro 3: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

O quadro 4 demonstra os ensaios necessários para a validação segundo sua categoria.

Quadro 4: Características de Validação recomendadas dos vários tipos de testes.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim
	Intermediária	**	**	Não	**
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003.

Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, é admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (SHABIR, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A validação para métodos cromatográficos de ensaio de teor, como para a determinação de teor de filtros solares em formulações comerciais, enquadra-se na categoria I da Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), havendo a necessidade da comprovação de especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez. As definições destes parâmetros são:

2.6.1 Especificidade

A Especificidade de um método analítico é a capacidade de determinar com exatidão somente a substância de interesse na presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz.

Para análise quantitativa (teor), a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o teste não é afetado por estes materiais. Quando a impureza ou padrão do produto não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados dos testes das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; SHABIR, 2003).

Para métodos cromatográficos, deve-se tomar precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detetor de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

2.6.2 Linearidade

A busca da linearidade de um método analítico está em obter resultados diretamente proporcionais às concentrações da substância em estudo (LEITE, 1998). Ela está diretamente relacionada com o sistema analítico. Teoricamente a linearidade determina a região da curva resposta ou de quantificação onde há relação direta sinal/concentração (LEITE, 2002). No caso da determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, estas concentrações devem estar compreendidas entre 80 e 120% da concentração teórica do teste (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

O coeficiente de correlação (r) expressa a relação de x a y na curva, onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a relação, maior a probabilidade de existir uma relação linear definida. Caso os valores tendam a zero, não há relação linear (LEITE, 2002).

Para determinação da linearidade, o ensaio é realizado utilizando-se no mínimo cinco concentrações conhecidas do padrão (em triplicata) e, essas concentrações devem estar abrangidas no intervalo especificado pelo método. Com esses dados, constrói-se uma curva de calibração com as concentrações da substância *versus* a resposta gerada no ensaio, isto é, uma regressão linear simples para analisar a relação funcional entre duas variáveis. (LEITE, 1998). Pela equação da reta ($y = a x + b$) pode-se determinar a concentração de um determinado analito utilizando-se a expressão: $C_a = (y - b) / a$; onde C_a é a concentração do analito (variável independente na curva); b é o coeficiente linear da reta; y é o sinal analítico (variável dependente na curva); e a é o coeficiente angular da reta.

A aceitabilidade da linearidade será julgada por:

1. Coeficiente de correlação (r), que expressa o quão próximo a uma reta perfeita está a relação de x e y na curva;
2. Intercepto, que traduz uma medida de tendência do método (um erro sistemático).

(LEITE, 1998)

A aceitação do coeficiente de correlação deve ser um critério obtido pelo grupo de confiabilidade, assim como o número de decimais a ser utilizado (LEITE, 2002). Pela nossa legislação, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser próximo a unidade (0,99 ou mais). (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

2.6.3 Intervalo de confiança

O intervalo de confiança é a faixa entre os limites de quantificação inferior e superior de um método analítico. Normalmente é derivado do produto da linearidade e dependente da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação que o método apresenta precisão, exatidão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado. No caso de determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, o intervalo de análise deve ser entre 80 e 120% da concentração teórica do teste (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; SHABIR, 2003).

2.6.4 Precisão

Precisão é a concordância entre os vários valores experimentais obtidos, quanto mais próximos entre si estiverem, ou seja, maior será a precisão quanto menor for a amplitude das medidas (A) (LEITE, 2002). A precisão deve ser considerada em três níveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003):

- a) *Repetibilidade*: é a máxima diferença aceitável entre duas repetições (dois resultados independentes, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições) (LEITE, 2002; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Por considerar a mesma condição, é também chamada de precisão intra-corrída.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, SHABIR, 2003).

b) *Precisão intermediária*: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). É denominada, também, por precisão inter-corridas.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

c) *Reprodutibilidade*: é a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. É a precisão inter-laboratorial (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A reprodutibilidade pode ser conceituada também, para uma amostra, quando esta é analisada por instrumentos diferentes, obtendo-se desvio aceitável e compatível. De forma geral a reprodutibilidade pode ser obtida a partir de: (LEITE, 2002)

- amostras diferentes do mesmo ponto amostral;
- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos;
- diferentes momentos;
- diferentes técnicas;
- diferentes calibrações;
- diferentes ajustes.

A precisão de um método analítico é normalmente expressa como a estimativa do desvio padrão ou do desvio padrão relativo (fórmula 3) de uma série de medidas e deve

incluir os estudos da média, do desvio padrão, desvio padrão relativo e intervalo de confiança.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Fórmula 3: Desvio padrão relativo (DPR), onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Não admite-se valores superiores a 5%, segundo a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

2.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em estudo em relação ao valor verdadeiro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão de um método analítico é normalmente expressa como o desvio percentual das concentrações calculadas em relação às concentrações reais (fórmula 4) (KARTAL, 2001; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, SHABIR, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

Fórmula 4: Exatidão de um método analítico; onde CME é a concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

2.6.6 Robustez

A robustez do método é a avaliação da variação da resposta do método ao se provocar pequenas alterações do procedimento. Indica sua confiança durante o uso normal. Se o grau de reprodutibilidade for alto, o método será determinado resistente e robusto. Para cromatografia líquida, os principais parâmetros que estão preconizados na Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 e que podem resultar em variação na resposta do método são os seguintes: variação do pH da fase móvel; variação da composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura; fluxo da fase móvel. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

3 Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar formulações fotoprotetoras comerciais quanto à composição dos filtros solares e valores de FPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma pré-avaliação da separação dos filtros solares por cromatografia em camada delgada (CCD).
- Desenvolver um método de avaliação do teor de filtro solar por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para formulações comerciais que seja específico, preciso, exato e reprodutível.
- Validar a metodologia desenvolvida.
- Avaliar formulações de amplo espectro, contendo um ou mais filtros solares em sua composição.
- Comparar as concentrações de filtros solares encontrados nas análises com as especificações do rótulo.
- Determinar o FPS *in vitro* de formulações comerciais utilizando o método de Mansur.
- Verificar se as formulações comerciais obedecem à resolução RDC n.º.161 de 11 de setembro de 2001 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001), que trata dos filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, limitando a concentração máxima de cada substância nas formulações.

4 Materiais e Métodos

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB3002;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD VP, auto injetor modelo SIL-10AD VP, detetor de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A VP e sistema de dados (*software*) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV – 2401PC;
- Potenciômetro DIGIMED – DME – CV4;
- Ultrapurificador de água ELGA – Elgastat maxim ultra pure water;
- Cuba cromatográfica de vidro, dimensões internas 20 x 20 x 8 cm;
- Placas cromatográficas de fase reversa RP-18 F_{254S} 5 x 20cm;
- Agitador mecânico Fisatom, modelo 713D, potência 70-130W com pá tipo turbina;

4.1.2 Reagentes

- CH₃CN (acetonitrila) para CLAE (marca Tedia) e grau P.A. (marca Vetec);
- CH₃OH (metanol) para CLAE (marca Tedia) e grau P.A. (marca Vetec);
- THF para CLAE (marca Tedia) e grau P.A. (marca Vetec);
- Etanol para CLAE (marca Tedia) e grau P.A. (marca Vetec);
- Isopropanol grau P.A. (marca Vetec);
- Chembase (marca Emelfar).

4.1.3. Padrões de filtros solares

Como não há disponível substâncias químicas de referência (padrões primários) dos filtros solares pela Farmacopéia Brasileira nem por qualquer outra, utilizou-se como

padrões matérias primas com teor de pureza declarado, cedida pela empresa Spectrum Química Ltda.

Todos os filtros UV utilizados neste trabalho são permitidos ao uso em cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal, de acordo com a resolução RDC nº 161, de 11 de setembro de 2001.

- Benzofenona-3: 102,7%
- Octil dimetil PABA: 99,1%
- p-metoxicinamato de octila 98,5%
- Salicilato de octila: 102,4%
- Octocrileno: 99,2%
- Avobenzona: 98,2%

4.1.4 Produtos analisados

Foram analisadas diferentes formulações contendo os seguintes filtros solares:

- benzofenona-3 (BZ3) (figura 15),
- octil dimetil PABA (ODP) (figura 16),
- p-metoxicinamato de octila (MCO) (figura 17),
- salicilato de octila (SO) (figura 18),
- octocrileno (OCT) (figura 19) e
- butil metoxi dibenzoil metano (avobenzona) (AVO) (figura 20).

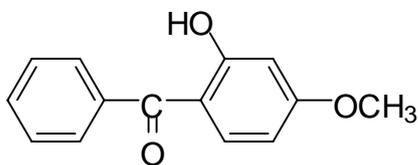


Figura 15: Estrutura molecular do filtro solar benzofenona-3.

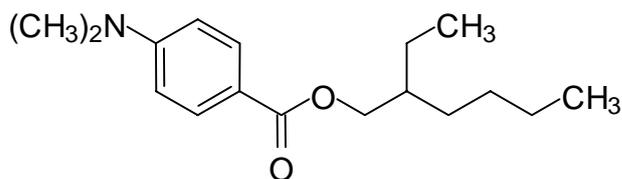


Figura 16: Estrutura molecular do octil dimetil PABA.

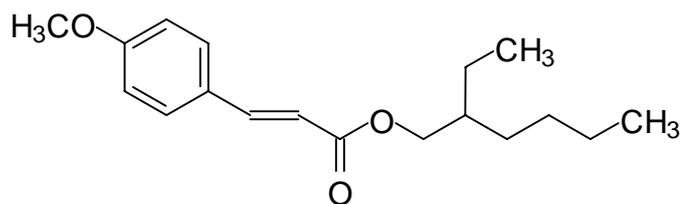


Figura 17: Estrutura molecular do filtro solar *para*-metoxicinamato de octila.

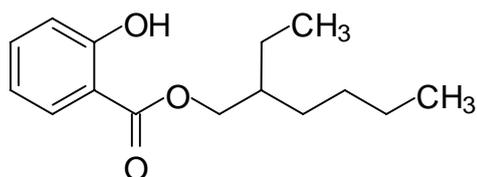


Figura 18: Estrutura molecular do filtro solar salicilato de octila.

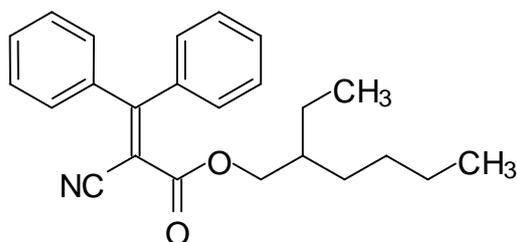


Figura 19: Estrutura molecular do filtro solar octocrileno.

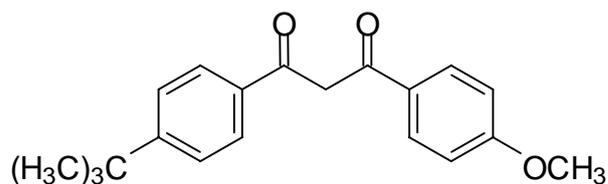


Figura 20: Estrutura molecular do filtro solar butil metoxidibenzoil metano (ou avobenzona).

As formulações selecionadas para serem analisadas foram loções cremosas encontradas no comércio ou em farmácias com manipulação e suas composições, FPS e origem estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Formulações analisadas:

Formulação	Composição	FPS	Origem
A	BZ3 – 5% OCT – 10% AVO – 4% SO – 5%	30	Indústria de cosméticos e produtos dermatológicos
B	AVO – 3% OCT – 10%	15	Laboratório farmacêutico
C	BZ3 – 2,5% MCO – 7,5%	15	Laboratório farmacêutico
D	BZ3 – 1% MCO – 2%	4	Laboratório farmacêutico
E	BZ3 – 2% MCO – 7%	8	Laboratório farmacêutico
F	BZ3 – 4% MCO – 7,5%	15	Laboratório farmacêutico
G	BZ3 – 0,5% MCO – 4%	4	Laboratório farmacêutico
H	MCO – 6,95%	8	Farmácia com manipulação
I	ODP – 1,99% MCO – 6,95% BZ3 – 2,96%	15	Farmácia com manipulação
J	ODP – 4,94% MCO – 6,95% BZ3 – 2,96%	25	Farmácia com manipulação
L	ODP – 6,92% MCO – 6,95% BZ3 – 2,96%	30	Farmácia com manipulação

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Avaliação da separação cromatográfica:

Pode ser descrita como um sistema de avaliação das amostras a serem analisadas e do equipamento, partes eletrônicas e operações analíticas como um todo. Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser verificada através do desvio padrão relativo das áreas obtidas por várias injeções do padrão, calculando a reprodutibilidade das injeções e a resolução (seletividade α), fator de capacidade (k'), resolução (R) e fator de cauda ou simetria do pico (T).

Para avaliar a separação da mistura de filtros solares pela CLAE, será utilizada uma mistura dos padrões dos filtros solares para a construção da curva de calibração. Para esta mistura serão testados alguns solventes como fases móveis e cinco concentrações de cada composto para o cálculo da equação de calibração e os coeficientes de correlação (r). O objetivo é conseguir a melhor separação dos componentes (k' adequado), a melhor resolução (R), observando-se os tempos de retenção de cada componente e a pressão resultante no sistema.

Como uma avaliação prévia da separação cromatográfica, considerando que muitas das substâncias avaliadas possuíam estruturas semelhantes e, por isso, características físico-químicas semelhantes, foi utilizada a técnica da cromatografia em camada delgada utilizando-se placas de fase reversa (C_{18}), isto é, apolar, para simular as condições de afinidade que ocorre na CLAE por fase reversa.

Para o ensaio de CCD, colocou-se na cuba cromatográfica a fase móvel e um papel de filtro com dimensões de 19 x 19 cm, esperando por aproximadamente 30 minutos antes de se proceder o ensaio, para que o ambiente interno ficasse saturado com a fase móvel. Nas placas cromatográficas de fase reversa, marcou-se a 1,0 cm do início da placa uma linha a lápis na qual ia ser aplicada a solução amostra e também, 15cm acima desta primeira linha, marcou-se uma linha final. Aplicou-se, na linha inicial, 10 μ L de uma solução a 1% de cada substância (filtro solar) em acetonitrila, assim como uma solução

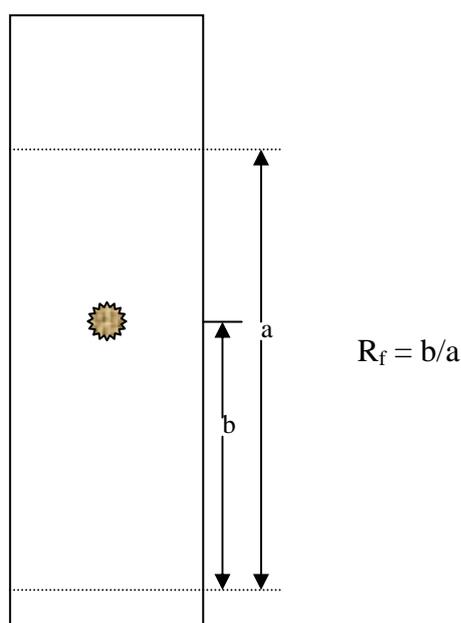
contendo mais de um filtro solar para avaliar a separação da mistura e o fator de retenção (R_f).

A placa era acondicionada na cuba cromatográfica e lá permanecia até que a frente da fase móvel atingisse a segunda linha marcada, a 15cm de distância. As manchas (spots) das substâncias eram analisadas numa câmara com lâmpada UV com comprimentos de onda de 365 e 354 nm

Calculou-se o R_f (fator de retenção) pela fórmula 5 descrita a seguir (BAUER *et al*, 1991).

Fórmula 5: Cálculo do fator de retenção.

$$R_f = \frac{\text{Distância (zona inicial – zona da substância)}}{\text{Distância (zona inicial – frente do solvente)}}$$



Esquema 1: Representação da determinação do valor do fator de retenção.

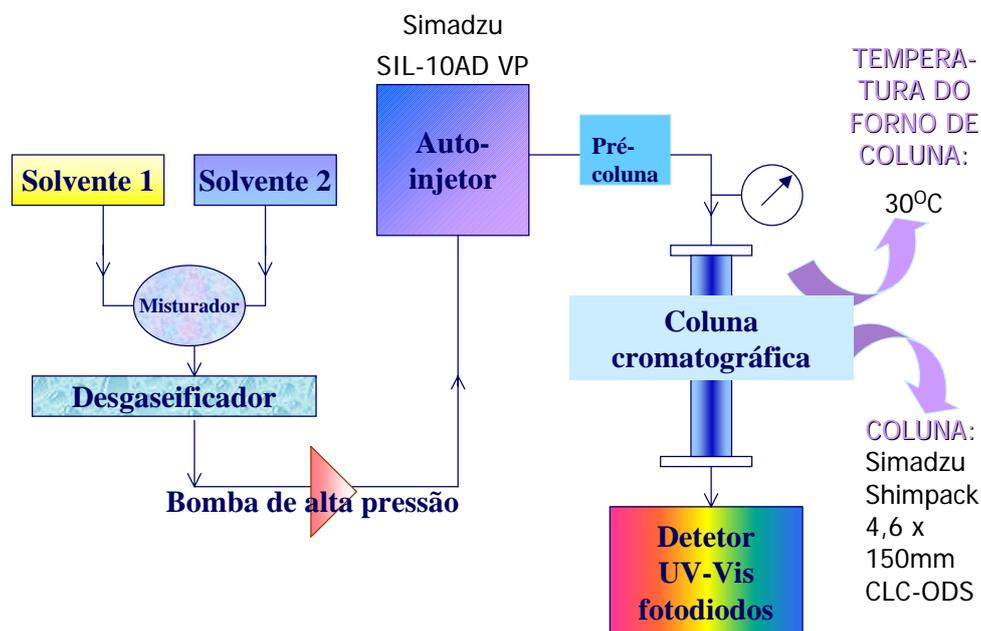
4.2.2 Análise do teor de filtros solares

Utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detetor de arranjos de fotodiodos (CLAE-DAD), quantificou-se os filtros solares das formulações baseado na determinação prévia da curva padrão e formulação preparada para a validação.

Como foram analisadas formulações de composição muito heterogênea, tiveram que ser desenvolvidos dois métodos: método I e método II, cujos parâmetros utilizados estão descritos na tabela 3 e mostrados no esquema 2.

Tabela 3: Condições cromatográficas.

Fase estacionária:	Coluna de fase reversa Shimpack 4.6 x 150 mm CLC-ODS (Shimadzu) – octadecil silano, granulação de 5 µm
Fases móveis:	Dependendo da composição da formulação, foram utilizadas duas fases móveis: <ul style="list-style-type: none"> ◆ CH₃CN : H₂O pH=2,70 por H₃PO₄ (93:07) – MÉTODO I ◆ THF : H₂O (60:40) – MÉTODO II
Vazão:	1,0 mL/min
Injeção de amostra:	20 µL
λ de quantificação:	304, 330 e 352 nm
Temperatura do forno de coluna:	30 °C
Tempo de corrida	7 min



Esquema 2: Esquema do equipamento utilizado.

4.2.2.1 Preparo da solução padrão:

As soluções dos padrões foram preparadas diluindo-se as substâncias que possuíam o teor declarado na fase móvel. Para isso, foram utilizados solventes grau P.A., balões volumétricos e pipetas volumétricas. Essas soluções foram utilizadas para construir as curvas padrões para a validação e quantificação dos métodos. As concentrações finais das soluções estão na tabela 4.

Tabela 4: Concentração dos padrões das curvas de calibração:

CURVA 1				
Filtros solares	BZ3	AVO	OCT	SO
Concentração (µg/mL)	25,0; 37,5; 50,0; 62,5; 75,0	20; 30; 40; 50; 60	50; 75; 100; 125; 150	25; 37,5; 50; 62,5; 75

CURVA 2		
Filtros solares	BZ3	MCO
Concentração (µg/mL)	2,5; 10; 20; 35; 50	10; 30; 50; 75; 150

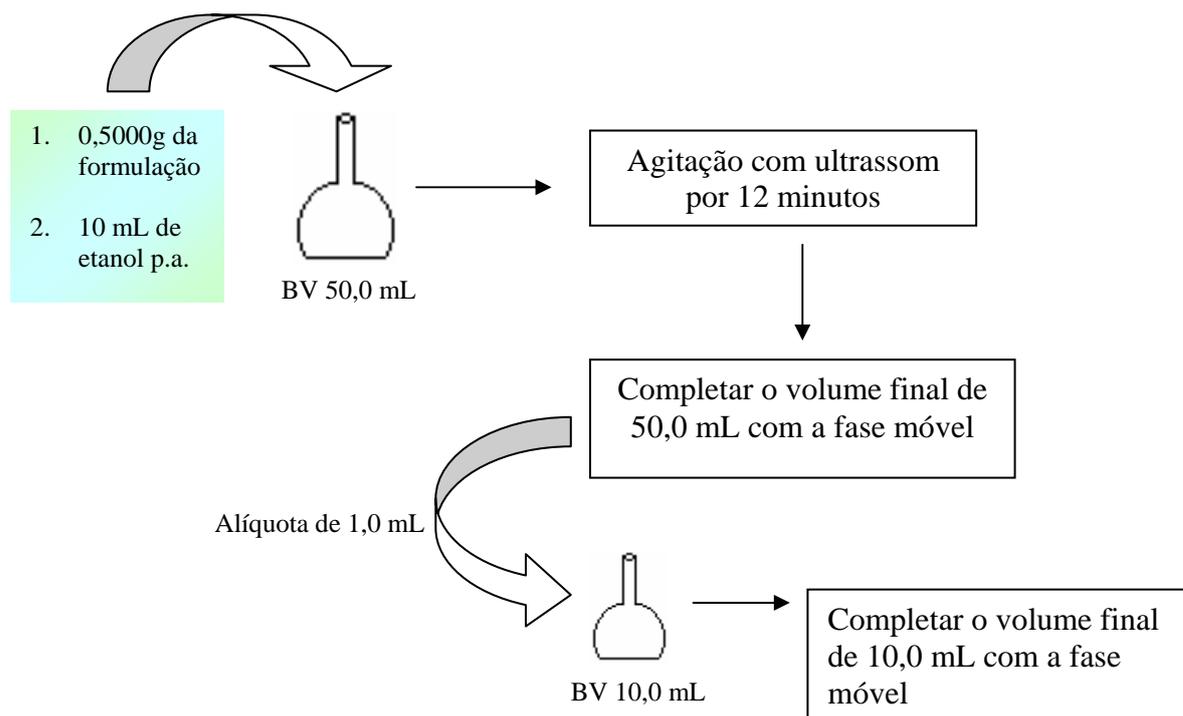
CURVA 3			
Filtros solares	BZ3	MCO	ODP
Concentração (µg/mL)	10; 20; 30; 40; 50	35; 52,5; 70; 87,5; 105	10; 30; 50; 70; 90

4.2.2.2 Construção da curva padrão

A solução de padrão foi feita em triplicata e cada diluição foi injetada 2 vezes no cromatógrafo. A média das áreas resultantes das injeções 1 e 2 constituiu um ponto na curva. A curva padrão, então, era construída por 15 pontos (triplicata de 5 concentrações) para a verificação da linearidade.

4.2.2.3 Preparo da solução da amostra:

O preparo das soluções das amostras a serem quantificadas se deu de acordo com o esquema 3. Esse procedimento foi seguido tanto para as formulações comerciais analisadas quanto para as formulações do ensaio de recuperação de substância ativa preparada para a validação dos métodos.



Esquema 3: Preparo da solução das amostras.

4.2.2.4 Quantificação da amostra:

A solução da amostra foi feita em triplicata e cada uma injetada 2 vezes no cromatógrafo. A quantificação foi feita em cada injeção e o desvio padrão e o desvio padrão relativo foram calculados com 6 (seis) resultados.

4.2.3 Validação do método

Para a conseqüente validação do método analítico desenvolvido para a determinação do teor de filtros solares em formulação fotoprotetoras, serão calculados os parâmetros segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Como foram analisadas formulações de composição muito heterogênea, e por isso, desenvolvidos dois métodos de quantificação, tiveram que ser feitas 2 (duas) validações: validação para o método I e validação para o método II. Para a validação do método I, utilizou-se dois tipos de formulação para o ensaio de recuperação.

4.2.3.1 *Formulações para a validação dos métodos:*

As formulações para o ensaio de recuperação foram feitas com 80, 100 e 120% da concentração dos filtros solares das amostras. Para analisar as formulações A e B (pelo método I), o teste de recuperação foi feito com as formulações descritas na tabela 8.

Tabela 5: Formulações 1.1, 1.2 e 1.3 para validação do método I:

Ingredientes	Formulação 1.1 (80%)	Formulação 1.2 (100%)	Formulação 1.3 (120%)
1. BZ3	4,0 %	5,0 %	6,0 %
2. AVO	3,2 %	4,0 %	4,8 %
3. SO	4,0 %	5,0 %	6,0 %
4. OCT	8,0 %	10,0 %	12,0 %
5. Chembase ®	4 %	4 %	4 %
6. Phenova ®	0,5 %	0,5 %	0,5 %
7. Germal 115 ®	0,2 %	0,2 %	0,2 %
8. BHT	0,10 %	0,10 %	0,10 %
9. Água destilada	qsp 100g	qsp 100g	qsp 100g

Chembase ® é uma base auto-emulsionante, constituinte da fase oleosa da formulação; Phenova ® é uma mistura de parabenos (metil, etil, propil e butil parabenos), compostos com atividade antifúngica e bactericida (gram-positivos e gram-negativos) para a preservação da formulação; Germal 115 ® é uma solução de imidazolinidil uréia (ou imiduréia) (figura 21) que atua na conservação de cosméticos e formulações tópicas dermatológicas, possuindo ainda, efeito sinérgico com os parabenos; BHT (butil hidróxi-

tolueno) (figura 22) é um composto fenólico com atividade antioxidante utilizado em cosméticos, medicamentos e alimentos (WADE & WELLER, 1994).

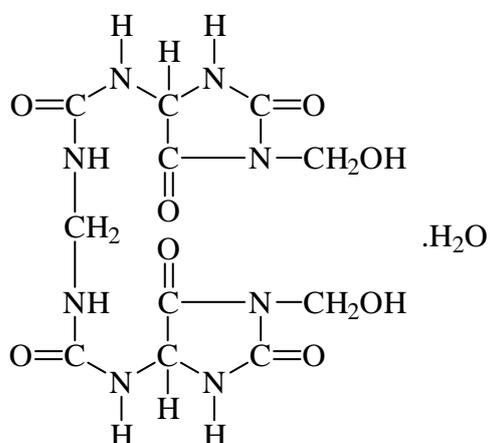


Figura 21: Estrutura da imiduréia

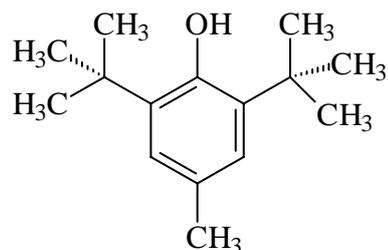


Figura 22: Estrutura do BHT

Os ingredientes 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 (fase oleosa da emulsão) foram aquecidos em recipiente de inox a 70°C, separadamente, dos componentes 7 e 9 (fase aquosa) que foram aquecidos a 75°C, em outro recipiente de inox. Ao atingir essa temperatura, as duas fases foram misturadas sob agitação mecânica a 1170 ± 100 rpm, usando pá tipo turbina para uma melhor homogeneidade no tamanho das micelas da emulsão.

Para validar o método de quantificação das formulações “C”, “D”, “E”, “F”, “G” e “H”, foram utilizadas as formulações 2.1 (equivalente a 80% da concentração mais baixa), 2.2 (equivalente a média das concentrações da substância nas formulações amostras), e 2.3 (equivalente a 120% da concentração mais alta), descritas na tabela 9. O modo de preparo destas formulações foi semelhante ao descrito para as formulações anteriores. A principal diferença foi a composição da fase oleosa devido à menor quantidade e variedade dos filtros solares.

Tabela 6: Formulações 2.1, 2.2 e 2.3 para validação do método I:

Ingredientes	Formulação 2.1	Formulação 2.2	Formulação 2.3
	(80%)	(100%)	(120%)
1. BZ3	0,4 %	2,25 %	4,8 %
2. MCO	1,6 %	4,75 %	9,0 %
3. Chembase ®	4 %	4 %	4 %
4. Phenova ®	0,5 %	0,5 %	0,5 %
5. Germal 115 ®	0,2 %	0,2 %	0,2 %
6. BHT	0,10 %	0,10 %	0,10 %
7. Água destilada	qsp 100g	qsp 100g	qsp 100g

Para validar o método de quantificação das formulações “I”, “J” e “L”, foram utilizadas as formulações 3.1 (equivalente a 80% da concentração mais baixa), 3.2 (equivalente a média das concentrações da substância nas formulações amostras), e 3.3 (equivalente a 120% da concentração mais alta), descritas na tabela 10. O modo de preparo destas formulações foi semelhante às formulações anteriores, variando apenas na composição dos filtros solares contidos.

Tabela 7: Formulações 3.1, 3.2 e 3.3 para validação do método II:

Ingredientes	Formulação 3.1	Formulação 3.2	Formulação 3.3
	(80%)	(100%)	(120%)
1. BZ3	2,4 %	3,0 %	3,6 %
2. MCO	5,6 %	7,0 %	8,4 %
3. ODP	1,6 %	5,0 %	8,4 %
4. Chembase ®	4 %	4 %	4 %
5. Phenova ®	0,5 %	0,5 %	0,5 %
6. Germal 115 ®	0,2 %	0,2 %	0,2 %
7. BHT	0,10 %	0,10 %	0,10 %
8. Água destilada	qsp 100g	qsp 100g	qsp 100g

4.2.4 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

Para a determinação do FPS de cada produto, foi utilizado o método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (MANSUR, 1986) e utilizado por outros autores (GARCIA & SANTOS, 1990; BARTH, 2000). Mede-se a absorvância de uma solução da formulação feita em triplicata e preparada de acordo com o item 4.2.4.1, em vários comprimentos de onda (descritos no item 4.2.4.2) para depois calcular o FPS correspondente através da fórmula 2 e utilizando os valores da tabela 2.

4.2.4.1 Preparo da solução:

Pesar exatamente cerca de 0,500g da amostra e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL, contendo cerca de 30 mL de etanol p.a; solubilizar e completar o volume com o mesmo solvente. Tomar uma alíquota de 1,0mL e transferir para balão volumétrico de 25,0 mL. Completar o volume com o etanol p.a. e homogeneizar. A concentração final será de 0,2 mg/mL, que é a concentração padronizada para o cálculo do FPS.

4.2.4.2 Análise no espectrofotômetro:

A análise foi feita em triplicata e as absorvâncias das soluções das amostras foram medidas no espectrofotômetro após o ajuste da abertura da fenda de 2,0 nm, com intervalo de leitura de 1nm. O etanol p.a. foi utilizado como líquido de referência e o espectro registrado foi entre 220 a 450 nm. O FPS médio foi calculado pela fórmula 2 (Cálculo do FPS segundo Mansur).

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

Fórmula 2: Cálculo do FPS segundo Mansur (MANSUR, 1986).

Onde, **FC** = fator de correção (igual a 10); **EE (λ)** = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; **I (λ)** = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; **Abs (λ)** = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

Quadro 2: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda: (MANSUR, 1986)

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

5 Resultados e Discussão

5.1 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA POR CCD

As fases móveis testadas foram constituídas de diferentes misturas de água, acetonitrila (CH_3CN), metanol (CH_3OH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), tetraidrofurano (THF). Utilizou-se também modificadores de fase móvel como o ácido acético, um ácido fraco, e o ácido fosfórico, um ácido forte.

Baseada no trabalho de Barth (BARTH, 2000), uma fase móvel constituída de água e acetonitrila, em diferentes proporções, foi inicialmente testada.

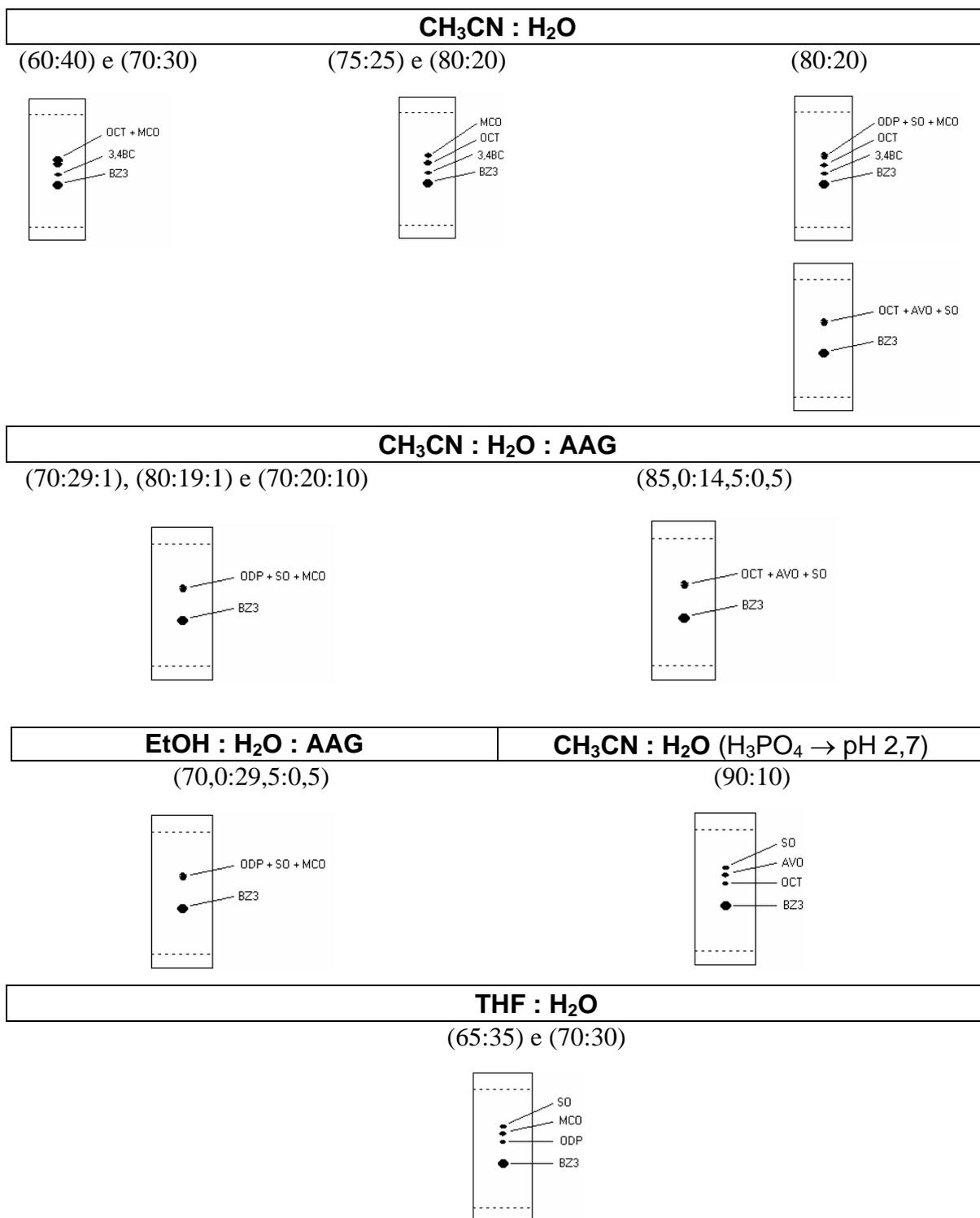
Buscando-se uma fase móvel para a separação de BZ3 (figura 15), 3-4BC (figura 17), MCO (figura 18) e OCT (figura 20), testou-se $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ em diversas proporções.

Em proporções de solvente orgânico menor que 75%, não se consegue separar OCT de MCO. Uma boa separação é atingida com uma mistura de 80:20 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$. Com esta última mistura de solventes e adicionando-se outros filtros, como ODP (figura 16) e SO (figura 19), não conseguimos uma boa separação desses novos filtros com o MCO. Devido à semelhança estrutural (vide figuras 16, 18 e 19, respectivamente), a separação dos filtros ODP, MCO e SO, corresponde à maior dificuldade de separação cromatográfica. Baseando-se no trabalho de DINUNZIO & GADDE (DINUNZIO & GADDE, 1990), conseguiu-se esta separação com a seguinte fase móvel: THF : H_2O (70:30). O THF mostra-se mais seletivo para estas substâncias, que apresentaram R_f 's de 0,406 para BZ3; 0,320 para ODP; 0,293 para MCO e 0,273 para SO.

Para uma mistura de BZ3, OCT, AVO (figura 17) e SO, esses três últimos filtros solares também não geram boa separação na fase móvel de 80:20 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (R_f 's de 0,480 para BZ3; 0,207 para OCT; 0,147 para AVO; e 0,147 para SO). Então, foram testadas outras fases móveis:

- EtOH: H₂O : AAG (70:29,5:0,5),
- MeOH : H₂O (80:20),
- CH₃CN : H₂O : AAG (70:29:1),
- CH₃CN : H₂O : AAG (80:19:1),
- CH₃CN : H₂O : AAG (85:14,5:0,5),
- CH₃CN : H₂O : AAG (70:20:10),
- THF : H₂O (70:30),
- CH₃CN : H₂O pH 2,70 com H₃PO₄ (80:20) e
- CH₃CN : H₂O pH 2,70 com H₃PO₄ (90:10).

Este último resultou em boa separação dos constituintes, com Rf's de 0,627 para BZ3; 0,420 para OCT; 0,333 para AVO; e 0,300 para SO. A fase móvel THF : H₂O (70:30) também resulta em separação dos constituintes. O esquema 4 mostra a avaliação da separação cromatográfica por CCD.



Esquema 4: Comportamento da separação e R_f dos filtro solares em CCD.

5.2 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos (conforme dito anteriormente) para se avaliar o teor de filtros solares em formulações comerciais: o primeiro método desenvolvido utilizando-se acetonitrila como o solvente orgânico da fase móvel para ser utilizado quando a amostra não for constituída pela mistura dos filtros p-metoxicinamato de octila com salicilato de octila e octil dimetil PABA concomitantemente, e um segundo método que utiliza THF e água na fase móvel, para ser utilizado quando a amostra tiver a mistura de p-metoxicinamato de octila e octil dimetil PABA. Das fases móveis testadas, somente a fase móvel constituída de THF e água é capaz de separar uma mistura desses filtros solares.

O cromatograma dos filtros solares benzofenona-3, avobenzona, salicilato de octila e octocrileno está no apêndice 9.7; o cromatograma dos filtros solares benzofenona-3 e p-metoxicinamato de octila está no apêndice 9.8; e o cromatograma dos filtros solares benzofenona-3, octil dimetil PABA e p-metoxicinamato de octila está no apêndice 9.9.

As condições cromatográficas referentes a essas separações estão relacionados na tabela 11.

Tabela 8: Condições cromatográficas:

MÉTODO 1:					
Filtros Solares	Ordem de eluição	α	k'	R	T
BZ3	1	-	1.06	-	1.33
OCT	2	2.23	2.35	4.50	1.13
AVO	3	1.15	2.70	1.20	1.25
SO	4	1.28	3.42	2.35	1.25
BZ3	1	-	1.01	-	1.33
MCO	2	2.75	2.77	2.75	1.25

MÉTODO 2:					
Filtros Solares	Ordem de eluição	α	k'	R	T
BZ3	1	-	1.65	-	1.75
ODP	2	1.88	3.11	3.30	1.29
MCO	3	1.21	3.76	1.42	1.19

Fórmulas, de acordo com USP 27 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2004):

$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0)$ onde, t_2 e t_1 são os tempos de retenção das substâncias, e t_0 é o tempo de retenção de uma substância não retida na coluna.

$k' = (t / t_0) - 1$ onde, t é o tempo de retenção da substância e t_0 é o tempo de retenção de uma substância não retida.

$R = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ onde t_2 e t_1 são os tempos de retenção das substâncias em análise, e W_1 e W_2 são a largura da base dos picos.

$T = W_{0,05} / 2f$ onde $W_{0,05}$ é a largura da base a 5% da altura do pico e f é a metade frontal do pico, demonstrado esquematicamente na figura 23.

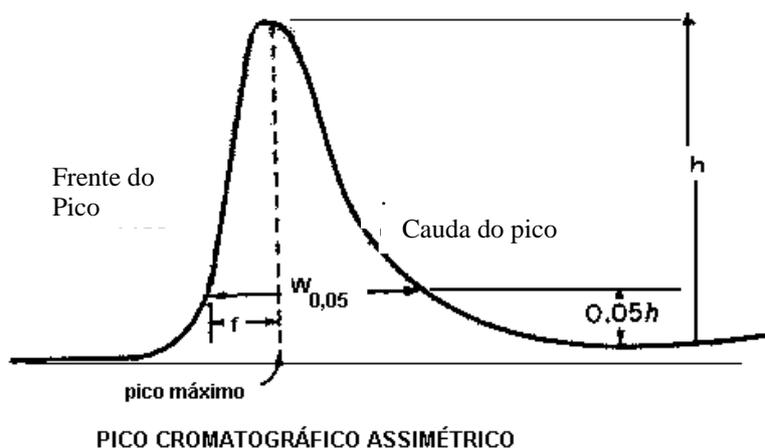


Figura 23: Pico cromatográfico assimétrico (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2004).

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FILTRO SOLAR

5.3.1 Comprimentos de onda de quantificação

Os comprimentos de onda nos quais se fez a quantificação de cada composto estão relacionados na tabela 12. Esses comprimentos de onda foram selecionados de acordo com a absorção de cada composto. Os anexos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram os gráficos em 3D dos compostos.

Tabela 9: Comprimentos de onda de quantificação:

Filtro solar	AVO	BZ3	OCT	SO	MCO	3,4BC	ODP
λ de quantificação	352	330	304	304	304	304	304

5.3.2 Curva de calibração

A construção da curva de calibração para BZ3 (gráfico 1), AVO (gráfico 2), OCT (gráfico 3) e SO (gráfico 4) foi feita com 5 (cinco) concentrações, em triplicata, de cada um dos filtros solares, e a seguir, construiu-se uma curva padrão final com esses resultados.

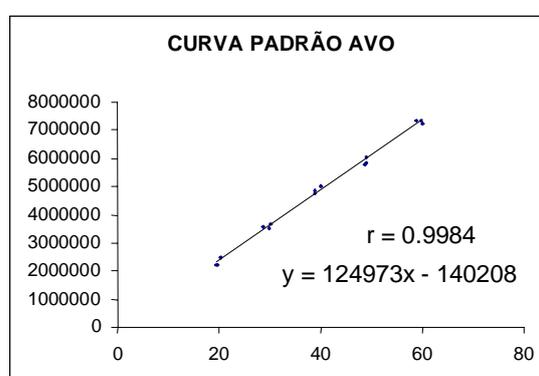
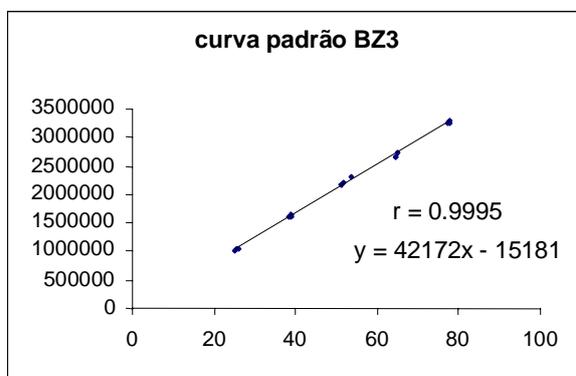


Gráfico 1: Curva padrão da benzofenona-3.

Gráfico 2: Curva padrão da avobenzona.

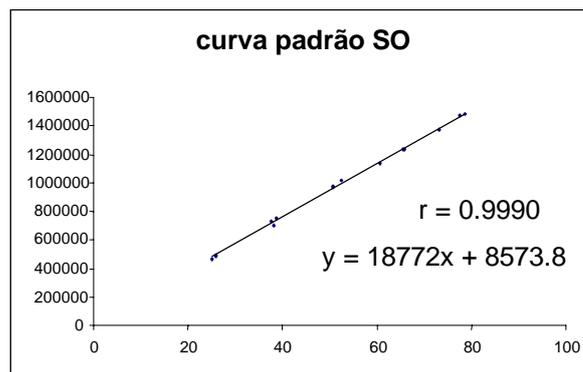
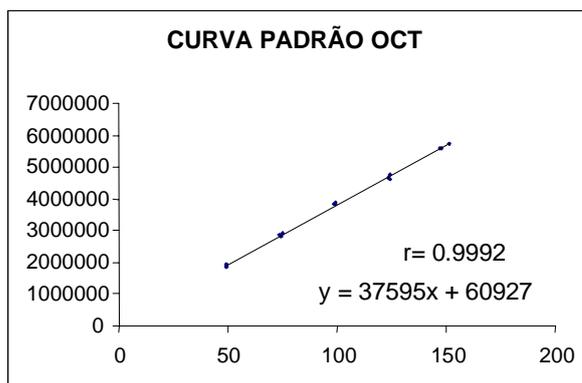


Gráfico 3: Curva padrão do octocrileno.

Gráfico 4: Curva padrão do salicilato de octila

Com a curva padrão da benzofenona-3 obteve-se coeficiente de correlação de 0,9995, demonstrando sua linearidade. Com a curva padrão da avobenzona, o coeficiente de correlação foi de 0,9984, demonstrando também sua linearidade. A mesma linearidade foi conseguida para o octocrileno, com coeficiente de correlação de 0,9992; e, para o salicilato de octila, a linearidade foi demonstrada com um coeficiente de correlação de 0,9990.

5.3.3 Validação do método

Para a validação, foram feitas 3 formulações contendo os filtros solares para o ensaio de recuperação como preconiza a resolução RE 899/03. Para a validação do método I foram confeccionadas seis (6) formulações, denominadas de “1.1”, “1.2”, “1.3”, “2.1”, “2.2” e “2.3” e, para a validação do método II, três formulações tiveram que ser produzidas: “3.1”, “3.2” e “3.3”. De cada uma dessas formulações, retirou-se 3 alíquotas e procedeu-se o ensaio de quantificação por CLAE. Na tabela 13 descreve-se a quantidade de cada substância adicionada e a quantidade recuperada em massa e porcentagem, com os respectivos desvios-padrão e, em seguida, mostram-se os cromatogramas de cada formulação (gráficos 5 a 13).

Tabela 10: Formulações para recuperação.

<i>Formulação</i>	<i>Adicionado na formulação (g%)</i>	<i>Recuperado (g%)</i>	<i>Recuperado (teor - %)</i>	
1.1	BZ3	4,01	4,10 ± 0,05	102,2
	AVO	3,36	3,45 ± 0,05	102,7
	SO	4,01	4,05 ± 0,05	101,1
	OCT	8,07	7,80 ± 0,10	96,7
1.2	BZ3	6,01	6,12 ± 0,04	100,4
	AVO	4,39	4,53 ± 0,03	103,2
	SO	6,04	6,01 ± 0,05	99,5
	OCT	11,59	11,86 ± 0,08	100,9
1.3	BZ3	6,01	6,18 ± 0,12	102,5
	AVO	5,04	5,18 ± 0,10	102,6
	SO	6,01	6,12 ± 0,12	101,7
	OCT	12,00	11,81 ± 0,24	98,1
2.1	BZ3	0,37	0,36 ± 0,09	99,2
	MCO	1,37	1,39 ± 0,37	101,5
2.2	BZ3	2,52	2,55 ± 0,60	101,1
	MCO	5,06	5,12 ± 0,13	101,3
2.3	BZ3	5,24	5,43 ± 0,13	103,7
	MCO	9,85	9,74 ± 0,24	99,0
3.1	BZ3	2,59	2,70 ± 0,08	104,2
	MCO	5,57	5,58 ± 0,07	100,2
	ODP	1,61	1,64 ± 0,02	101,6
3.2	BZ3	3,00	3,13 ± 0,05	104,3
	MCO	7,11	7,24 ± 0,09	101,8
	ODP	1,99	2,05 ± 0,02	103,1
3.3	BZ3	3,60	3,71 ± 0,19	103,14
	MCO	8,40	8,30 ± 0,11	99,0
	ODP	2,43	2,45 ± 0,03	100,78

- Cromatogramas das formulações utilizadas para ensaios de recuperação:

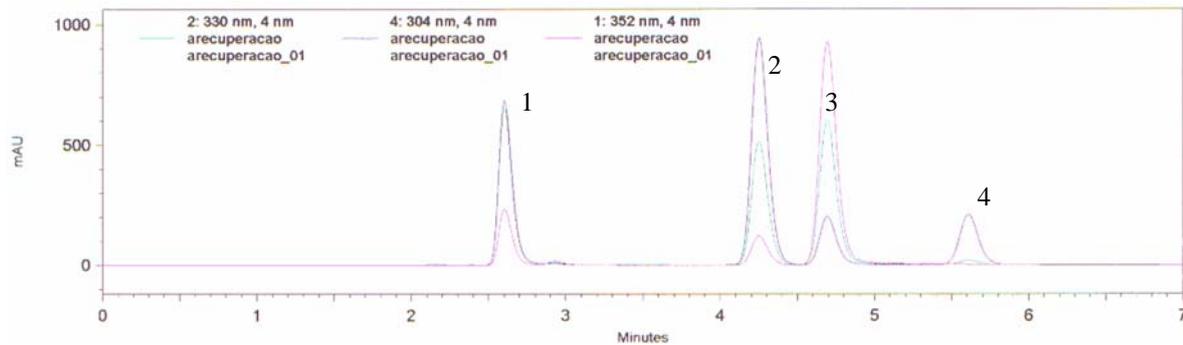


Gráfico 5: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.1. O pico número 1 corresponde ao filtro solar BZ3, o 2, OCT, o 3, AVO e o 4, SO.

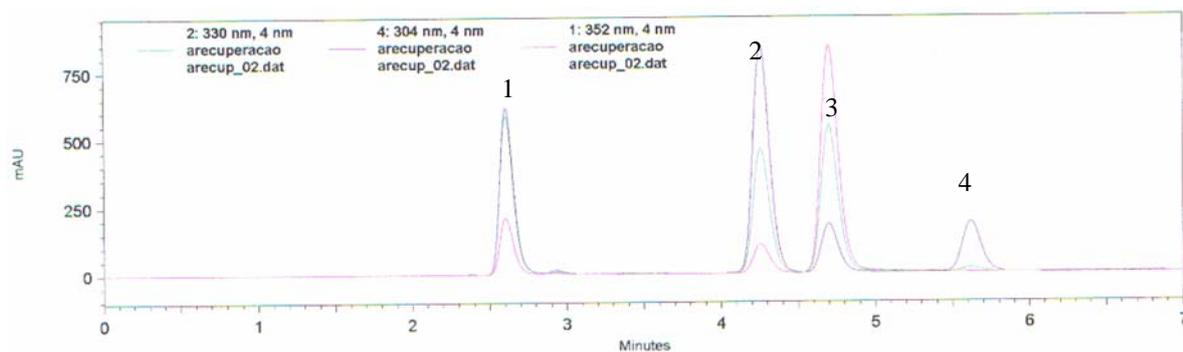


Gráfico 6: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.2. Da mesma forma que o gráfico 5, o pico número 1 corresponde ao filtro solar BZ3, o 2, ao OCT, o 3, AVO e o 4, ao SO.

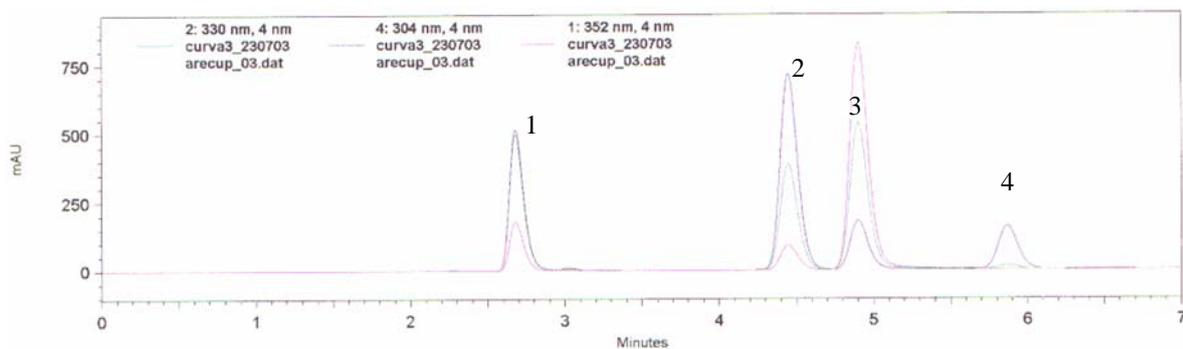


Gráfico 7: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 1.3. O pico número 1 corresponde ao filtro solar BZ3, o 2, OCT, o 3, AVO e o 4, SO.

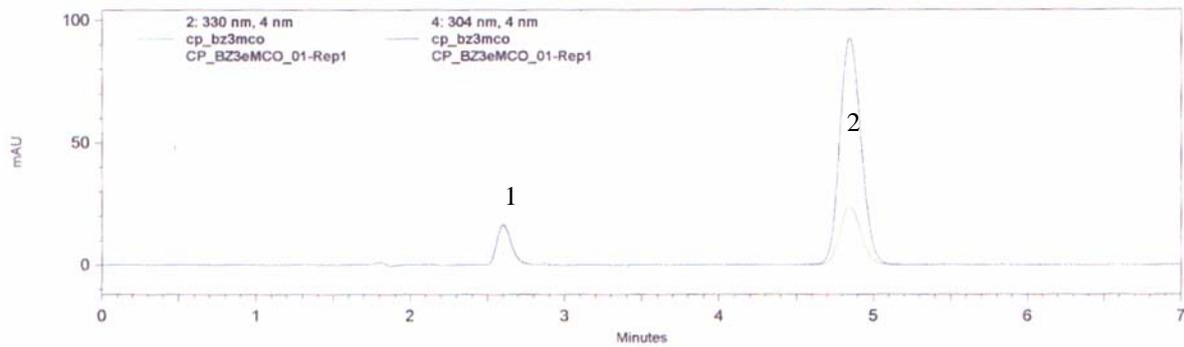


Gráfico 8: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.1. O pico de número **1** corresponde ao filtro solar BZ3 e o pico **2**, ao MCO.

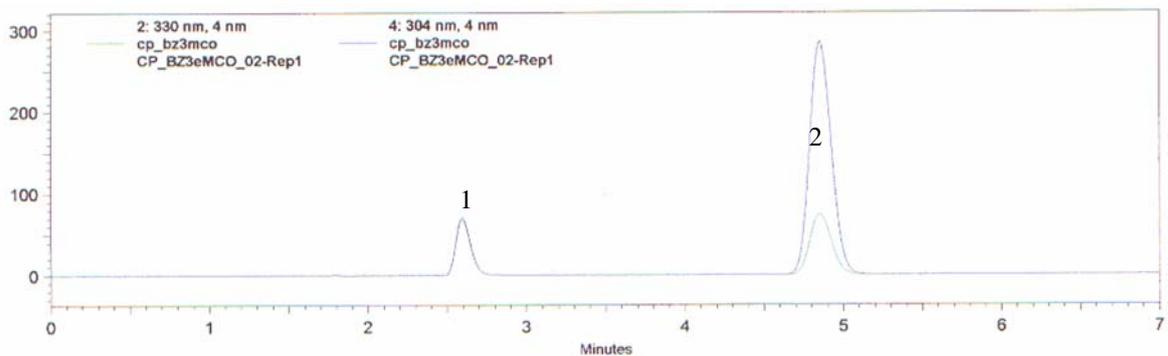


Gráfico 9: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.2. Da mesma forma que o gráfico 8, o pico de número **1** corresponde ao filtro solar BZ3 e o pico **2**, ao MCO.

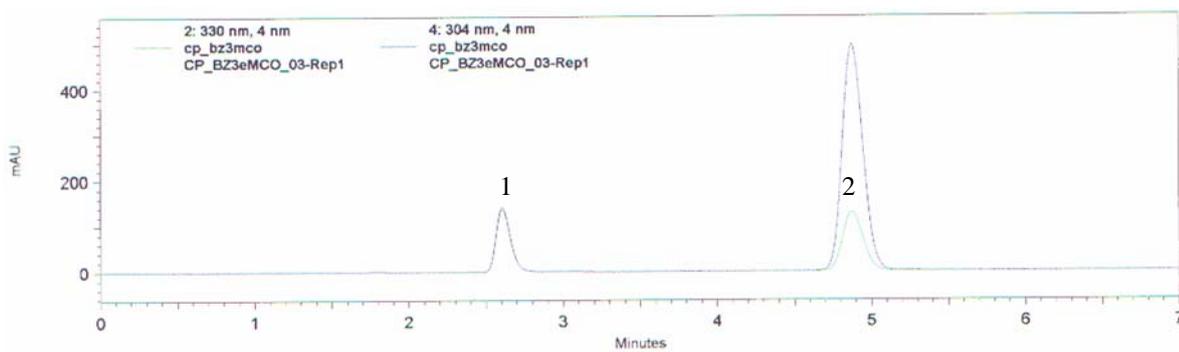


Gráfico 10: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 2.3. O pico número **1** corresponde ao BZ3 e o pico **2**, ao MCO.

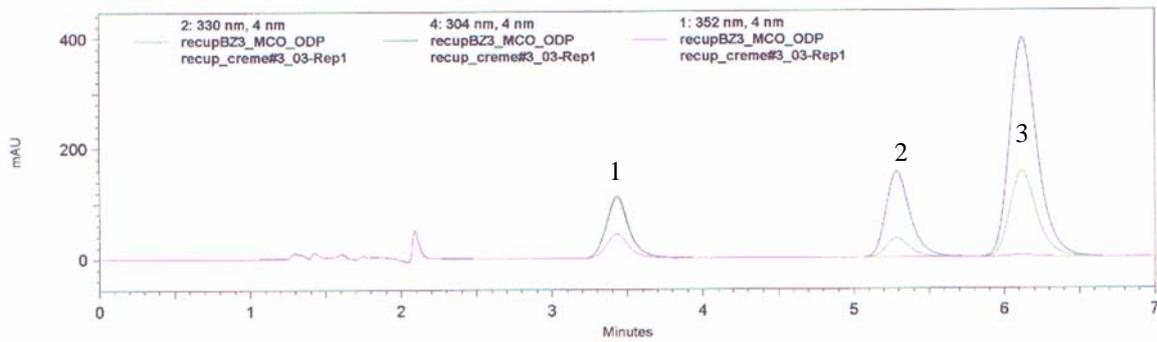


Gráfico 11: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.1. O pico de número **1** deste gráfico corresponde ao filtro solar BZ3; o pico **2**, ao ODP; e o pico **3**, ao MCO.

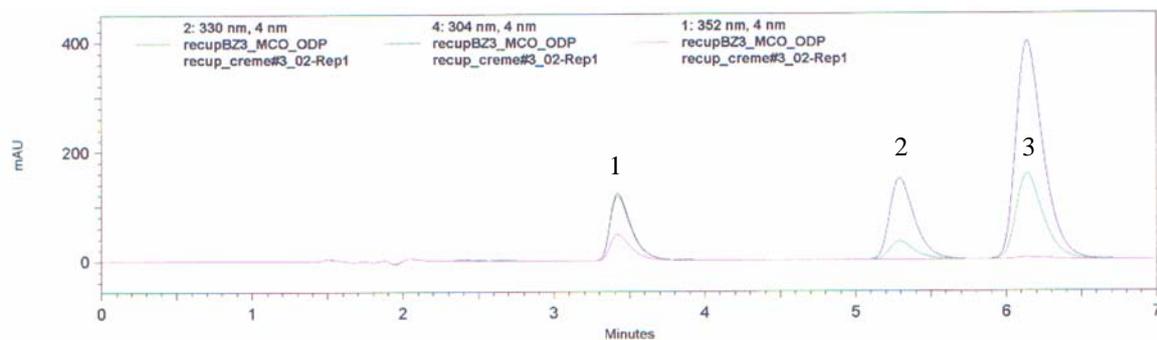


Gráfico 12: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.2. O pico de número **1** deste gráfico, da mesma forma que o gráfico 11, corresponde ao filtro solar BZ3; o pico **2**, ao ODP; e o pico **3**, ao MCO.

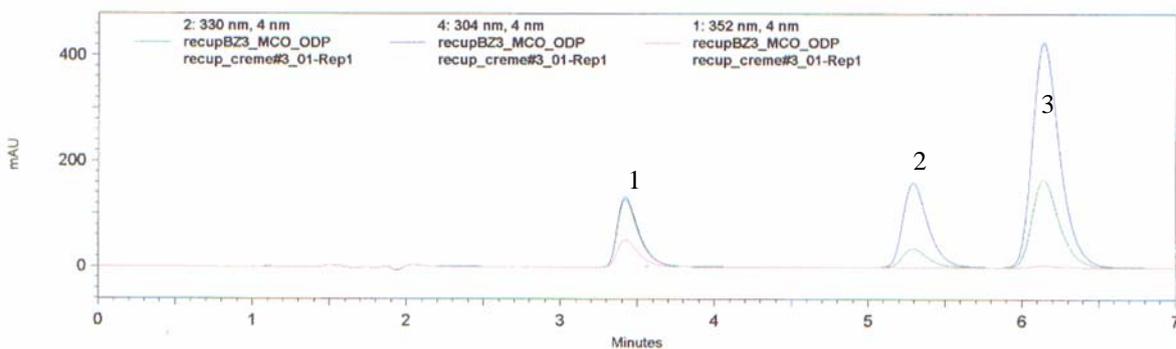


Gráfico 13: Cromatograma do ensaio de recuperação da formulação 3.3. O pico número **1** corresponde ao filtro solar BZ3; o pico **2**, ao ODP; e o pico **3**, ao MCO.

5.3.4 Formulações comerciais

Os resultados da quantificação das formulações “A” e “B” analisadas pelo método I estão relacionados na tabela 14. Esta tabela mostra o teor em relação ao declarado no rótulo dos produtos, além do desvio-padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 11: Resultados das formulações “A” e “B”.

Formulação		BZ3	AVO	OCT	SO
“A”	teor	101,47%	103,82%	99,91%	107,72%
	DP	1,18	1,07	1,31	1,29
	DPR	1,16%	1,03%	1,31%	1,19%
“B”	teor		97,71 %	103,80%	
	DP	Não contém	1,19	1,24	Não contém
	DPR		1,22%	1,19%	

Um desvio padrão relativo menor que 2% é considerado bom, enquanto valores acima de 5% indicam problemas com erros aleatórios (HASWELL, 1992). A legislação brasileira (Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003) não admite-se valores superiores a 5% (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Então, DPR abaixo de 5% é aceitável.

Os resultados da quantificação das formulações “C”, “D”, “E”, “F”, “G” e “H”, também analisadas pelo método I estão relacionados na tabela 15.

Tabela 12: Resultados das formulações “C”, “D”, “E”, “F”, “G” e “H”.

Formulação		BZ3	MCO
“C”	teor	108,86%	103,45%
	DP	1,60	1,42
	DPR	1,50%	1,37%
“D”	teor	101,95%	91,29%
	DP	2,09	2,26
	DPR	2,05%	2,47%
“E”	teor	103,71%	101,60%
	DP	1,05	0,81
	DPR	1,01%	0,79%
“F”	teor	100,44%	96,69%
	DP	1,19	1,28
	DPR	1,18%	1,32%
“G”	teor	92,62%	96,65%
	DP	1,28	0,70
	DPR	1,38%	0,72%
“H”	teor	107,96%	
	DP	1,19	Não contém
	DPR	1,11%	

Os resultados da quantificação das formulações “I”, “J” e “L” analisadas pelo método II estão relacionados na tabela 16.

Tabela 13: Resultados das formulações “I”, “J” e “L”.

Formulação		BZ3	MCO	ODP
“I”	teor	108,23%	102,53%	109,52%
	DP	2,54	2,44	2,61
	DPR	2,34%	2,38%	2,38%
“J”	teor	115,78%	112,84%	112,64%
	DP	2,10	2,21	2,22
	DPR	1,81%	1,96%	1,97%
“L”	teor	109,32%	102,27%	104,49%
	DP	0,32	0,12	0,10
	DPR	0,30%	0,11%	0,09%

5.4 DETERMINAÇÃO DO FPS DAS FORMULAÇÕES

O FPS rotulado e o FPS encontrado das formulações estudadas pela metodologia *in vitro* utilizada neste trabalho estão relacionados na tabela 17.

Tabela 14: FPS das formulações analisadas.

Formulação	FPS rotulado	FPS Encontrado
A	30	$34 \pm 0,66$
B	15	$8,6 \pm 0,54$
C	15	$15,0 \pm 0,61$
D	4	$4,4 \pm 0,23$
E	8	$14,4 \pm 0,46$
F	15	$16,1 \pm 0,18$
G	4	$7,1 \pm 0,42$
H	8	$11,6 \pm 0,67$
I	15	$18,8 \pm 0,65$
J	25	$23,5 \pm 0,19$
L	30	$25,5 \pm 0,74$

Observando a grande diferença encontrada do FPS rotulado com o determinado experimentalmente por este trabalho nas formulações “B”, “E”, “G”, “H”, “I”, foi feito um cálculo teórico do FPS resultante baseado no trabalho de BARTH *et al*, 1999 para indicar se o método *in vitro* utilizado estaria muito impreciso ou se eram as formulações que

estavam com quantidades incoerentes do filtro solar para o FPS declarado. O cálculo é feito somando-se a contribuição ao FPS de cada componente da formulação. As tabelas do trabalho citado com os cálculos realizados estão no anexo 9.10. Pode-se observar que a concentração de cada formulação daria FPS diferentes dos declarados, e próximos ao encontrado experimentalmente neste trabalho (tabela 18).

Tabela 15: Cálculo teórico do FPS das formulações “B”, “E”, “G”, “H” e “I”.

Formulação	FPS rotulado	FPS encontrado experimentalmente	FPS calculado*
B	15	$8,6 \pm 0,54$	7,0
E	8	$14,4 \pm 0,46$	11,9
G	4	$7,1 \pm 0,42$	6,4
H	8	$11,6 \pm 0,67$	10,3
I	15	$18,8 \pm 0,65$	16,3
L	30	$25,5 \pm 0,74$	24,4

*segundo BARTH et al, 1999.

6 Conclusões

A separação por cromatografia em camada delgada (CCD) mostrou-se eficaz como indicação da separação dos filtros estudados, pois observou-se que o comportamento das substâncias era o mesmo na CCD e na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Realizando CCD ao invés de CLAE nesta etapa do estudo, economiza-se solventes, pois são utilizados em menor quantidade, além destes serem mais baratos (grau de pureza menor). Além disso, a técnica da CCD é mais simples, de preparação mais rápida, e de interpretação imediata.

Foram desenvolvidos dois métodos para a quantificação dos filtros solares por CLAE. A maior diferença entre eles é a composição da fase móvel, a qual possui acetonitrila ou THF como solvente orgânico.

Os métodos desenvolvidos mostraram-se específicos, precisos, exatos e reprodutíveis. Ambos os métodos foram validados de acordo com a Resolução 899/2003 do Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MS/ANVISA).

Estes métodos foram eficazes para a determinação de teor de filtros solares em formulações comerciais, podendo-se analisar formulações de diferentes procedências e composições, tendo o cuidado de selecionar o método que melhor separa a mistura específica da formulação.

As formulações A, B, C, D, E, G, H, I e L mostraram resultados de teor filtro solar entre 90 e 100% do declarado no rótulo. Não existem especificações de faixa de teor recomendada para essas formulações cosméticas. A faixa que foi utilizada e está sendo proposta é de 90 a 110% (para as formulações).

A formulação J apresentou resultados superiores à faixa de aprovação considerada neste trabalho. A concentração ficou entre 112 e 116% do declarado. Esta formulação foi produzida numa farmácia com manipulação que será notificada.

O FPS das formulações foi determinado. Em seis (6) produtos, o FPS encontrado experimentalmente mostrou-se acima do rotulado. Estes dados foram confirmados quando utilizou-se o cálculo teórico do FPS que mostrou a mesma diferença. Isso demonstra que o FPS rotulado deve ser revisto.

O resultado do FPS da formulação “J” que obteve concentrações de filtros solares entre 112 e 116% do rotulado foi satisfatório (FPS 24).

Todas as formulações estudadas apresentaram-se em conformidade com a resolução RDC n.º.161 de 11 de setembro de 2001, não estando com quantidades de filtros ultravioleta acima do que se permite.

7 Perspectivas Futuras

A continuidade deste trabalho será dada da seguinte forma:

- ◆ na tentativa de estabelecer uma metodologia que abranja um maior número de filtros solares. Tentar-se-á utilizar pelo menos 7 (sete) filtros químicos diferentes durante a validação, para que se possa analisar composições mais heterogêneas.
- ◆ na análise de maior número de produtos comerciais escolhidos aleatoriamente para se conseguir uma estatística que demonstre a qualidade dos produtos no comércio.
- ◆ no desenvolvimento e implantação de uma metodologia *in vitro* de determinação do FPS de formulações que contenham também filtros solares físicos (chamados de bloqueadores solares), já que uma grande quantidade de formulações comerciais possuem este tipo de substância em sua composição. Esta metodologia será por espectrofotometria de reflectância.

8 Referências bibliográficas

- 1) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 161, de 11 de setembro de 2001. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=262> Acesso em: 28 mai. 2004.
- 2) _____. Resolução nº 237, de 22 de agosto de 2002. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=267>. Acesso em 28 mai. 2004.
- 3) _____. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5745>. Acesso em 28 mai. 2004.
- 4) ARMSTRONG, B.K., KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.63, p. 8-18, 2001.
- 5) AZZELLINI, S.C. Agentes potencializantes de fotoprotetores. *Cosm. & Toil.*, São Paulo, v.7, p.34-37, 1995.
- 6) BARTH, A.L; SANTOS, E.P.; SOARES, K.C. *et al.* Análise e seleção de filtros solares químicos com alta qualidade em proteção solar. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO RIO DE JANEIRO, RIOPHARMA, 1., 1999, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro : [s.n.], 1999. p.25-27.
- 7) BARTH, A.L. *Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos.* 2000. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- 8) BAUER, K.; GROS, L.; SAUER, W. *Thin layer chromatography: an introduction*. Alemanha : Merck, 1991. p. 10 -11.
- 9) BERG, A. O. Counseling to prevent skin cancer: recommendations and rationale. *Am J. Nurs.*, v. 104, n.4, p. 87-90, 2004. Disponível em <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>. Acesso em 31 mai. 2004.
- 10) BRIDGES, B.A. UV-induced mutations and skin cancer: how important is the link? *Mutation Res.*, v. 422, p. 23-30, 1998.
- 11) CHEDEKEL, M.R. A melanina pode melhorar os filtros solares. *Cosm. & Toil.*, São Paulo, v. 10, p. 60-69, 1998.
- 12) CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v.977, p. 277 – 280, 2002.
- 13) CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTÍ, M.C.; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatograph: use of cyclodextrins as mobile phase modifier. *J. Chromatogr. A*, v.921, p. 207 – 215, 2001.
- 14) CLYDESDALE, G.J.; DANDIE, G.W.; MULLER, H.K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.*, v. 79, p. 547-568, 2001.
- 15) COHEN, C.; DOSSOU, K.G.; ROUGIER, A. *et al.* Episkin: an in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties. *Toxicol. In Vitro*, v. 8, n. 4, p. 669-671, 1994.
- 16) DE PAOLA, M.V.R.V.; RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. *Cosm. & Toil.*, v.10, p.40-50, set-out. 1998.

- 17) DIFFEY, B.L. Indices of protection from in vitro assay of sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 589 – 600.
- 18) _____. Sunscreen isn't enough. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 64, p. 105-108, 2001a.
- 19) _____. When should sunscreen be reapplied? *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.45, n. 6, p.882-885, 2001b.
- 20) DINUNZIO, J.E.; GADDE, R.R, Determination of sunscreen compounds in topical sunscreen products. *J. Chromatogr.*, v. 519, p. 117 – 124. 1990.
- 21) ENCICLOPÉDIA de Absorvedores de UV para produtos com filtro solar. *Cosm. & Toil.*, São Paulo, v.7, p. 47 – 58, 1995.
- 22) EPSTEIN, J.H. Biological Effects of Sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 589 – 600.
- 23) ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.24, p.755-767, 2001.
- 24) ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration, Department of Health & Human Services, 1999. Sunscreens drug products for over-the-counter human use: final monograph. *Federal Register*, v.64, n.98, p.27666-27693. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/fdama/fedreg/sunscreen.pdf>>. Acesso em: abril de 2002.
- 25) GAGLIARDI, L.; CAVAZZUTTI, G.; MONTANARELLA, L. *et al.* Determination of sunscreens agents in cosmetic product by reversed-phase high-performance liquid chromatography, part II. *J. Chromatogr.*, v.464, p. 428 – 433. 1989.

-
- 26) GARCIA, S.; SANTOS, E.P. Avaliação do FPS de produtos comerciais por método in vitro. *R. Bras. Farm.*, v.71, n.4, p.99, 1990.
- 27) GARCIA, S.; SANTOS, E.P.; LIMA, M.T.L. *et al.* Associação de filtro químico com extrato vegetal. *Cosm. & Toil.*, São Paulo, v. 7, p. 38-40, 1995.
- 28) GIES, P.H.; ROY, C.R.; TOOMEY, S. *et al.* A. Protection against solar ultraviolet radiation. *Mutation Res.*, v. 422, p. 15-22, 1998.
- 29) GRANGER, K.L.; BROWN, P.R. The chemistry and HPLC analysis of chemical sunscreen filters in sunscreens and cosmetics. *J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol.*, v. 24, n. 19, p. 2895-2924, 2001.
- 30) GRUIJL, F.R.; VAN KRANEN, H.J.; MULLENDERS, L.H.F. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 63, p. 19-27, 2001.
- 31) GUIMARÃES, L.F.L., COLLINS, C.H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. São Paulo : Unicamp, 1997. p. 183-195.
- 32) HASWELL, S.J. *Practical guide to chemometrics*. New York : Marcel Dekker, 1992. p. 5 – 15.
- 33) IKEDA, K.; SUZUKI, S.; WATANABE, Y. Determination of sunscreens agents in cosmetic product by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 482, p. 240 – 245, 1989.
- 34) JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 215 – 225.

-
- 35)JOHNCOCK, W. Interação de formulações com filtro solar. *Cosm. & Toil.* São Paulo, v.12, p. 40-50, 2000.
- 36)KARTAL, M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.26, p. 857 – 864, 2001.
- 37)KIRCHOFF, V.W.J.H. *Ozônio e radiação UV-B.* São José dos Campos, SP: Transtec, 1995.
- 38)LEITE, F. *Validação em análise química.* 3 ed. Campinas : Átomo, 1998.
- 39)LÉPORI, L.R. *Miniatlas : a pele.* São Paulo: Soriak, 2002. p.74-77.
- 40)LEYDEN, J. What is photoaged skin? *Eur. J. Dermatol.*, v.11, n.2, p.165-167, 2001.
- 41)MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K. *et al.* Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. *J. Invest. Dermatol.*, v. 117, n. 2, p. 256-262, 2001.
- 42)MANSUR J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A., *et al.* Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, v.61, n.4, p. 121-124, 1986.
- 43)MARTI-MESTRES, G.; FERNANDEZ, C.; PARSOTAM, N. *et al.* Stability of UV filters in different vehicles: solvents and emulsions. *Drug Devel. Ind. Pharm.*, v. 23, n. 7, p. 647-655, 1997.
- 44)MOYAL, D.; COURBIÈRE, C.; LE CORRE, Y. *et al.* Immunosuppression induced by chronic solar-simulated irradiation in humans and its prevention by sunscreens. *Eur. J. Dermatol.*, v. 7, n. 3, p. 223-225, 1997.

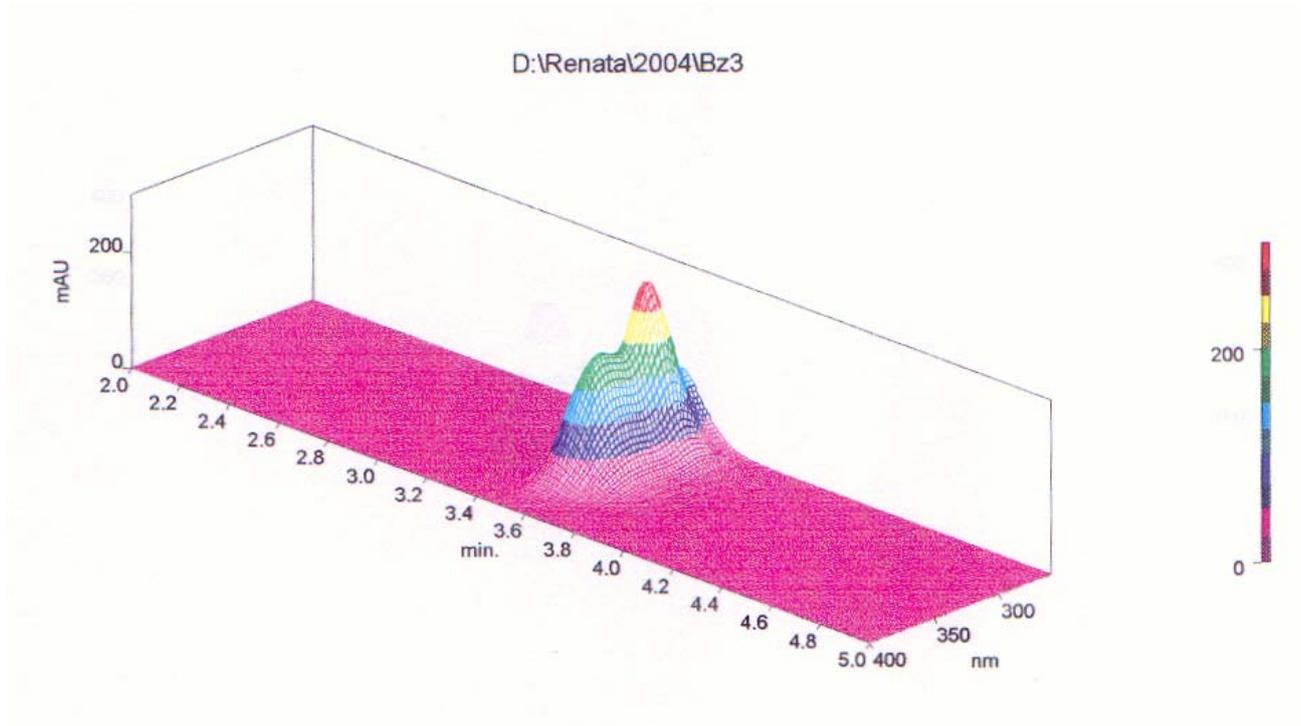
-
- 45) MURPHY, G.M. An update on photoprotection. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v.18, p. 1-4, 2002.
- 46) NORVAL, M. Effects of solar radiation on the human immune system. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 63, p. 28-40, 2001.
- 47) NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regul. Toxicol. Pharm.*, v. 33, p. 285-299, 2001.
- 48) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *WHO information fact sheets*. 1999. Disponível em <http://www.who.int/inf-fs/en/fact227.html>. Acesso em: 19 jun. 2002.
- 49) OZER, O.; MENEMENLIOGLU, D.; ERTAN, G. Photostability of menthyl anthranilate in different formulations. *Cosm. & Toil.*, v. 116, p. 67-72. 2001.
- 50) PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S. *et al.* Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, v. 246, p. 37-45. 2002.
- 51) RASTOGI, S.C.; JENSEN, G.H. Identification of UV filters in sunscreen products by high-performance liquid chromatography – diode-array detection. *J. Chromatogr.*, v. 828, p. 311 – 316, 1998.
- 52) ROY, C.R.; GIES, H.P.; LUGG, D.J. *et al.* The measurement of solar ultraviolet radiation. *Mutation Res.*, v. 422, p. 7-14, 1998.
- 53) RUVOLO JÚNIOR, E. C. proteção solar : comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (in vivo), FDA, COLIPA, SAA. *Cosmetics On Line*, v. 19, n. 105, p. 37-46, 1997.
- 54) SALVADOR, A.; DE LA OSSA, M.D.; CHISVERT, A. Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenona-3, octyl dimethyl PABA and octyl

- methoxycinnamate in lipsticks. *Int. J. Cosmetic Science*, v. 25, p. 97 – 102. 2003.
- 55) SANTOS, E.P.; FREITAS, Z.M.; SOUZA, K.R. *et al.* In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int. J. Cosmetic Science*, v. 21, p. 1 – 5. 1999.
- 56) SCALIA, S. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 870, p. 199-205, 2000.
- 57) SHAATH, N.A. Evolution of Modern Sunscreen Chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 589 – 600.
- 58) SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, v. 987, p. 57-66, 2003.
- 59) SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. Principles of instrumental analysis. 4. ed. Philadelphia : Saunders College Pub., 1992. p. 150-173.
- 60) SLINEY, D.H. Photoprotection of the eye: UV radiation and sunglasses. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.64, p. 166-175, 2001.
- 61) SMYRNIOTAKIS, C.G.; ARCHONTAKI, H.A. Development and validation of a non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in care formulations. *J. Chromatogr. A*, v. 1031, n. 1/2, p. 319-324, 2003. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219673>. Acesso em: abr. 2004.

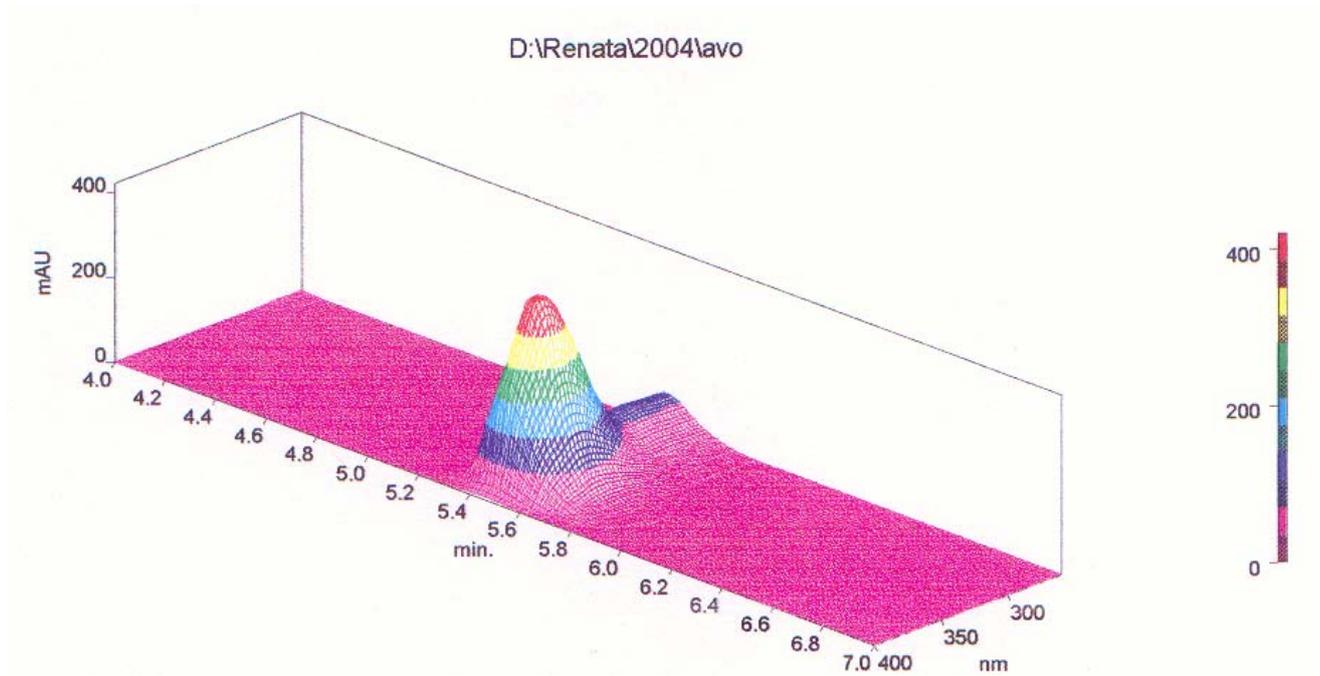
-
- 62) SPRINGSTEEN, A; YUREK, R.; FRAZIER, M. *et al.* In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal. Chim. Acta*, v. 380, p. 155-164, 1999.
- 63) UITTO, J.; BROWN, D.B.; GASPARRO F. *et al.* Molecular aspects of photoaging. *Eur. J. Dermatol.*, v. 7, n. 3, p.210-214, 1997.
- 64) UNITED STATES PHARMACOPEIA (Estados Unidos). USP 27 / NF 22, de 1 de janeiro de 2004. Physical tests <621> Chromatography. p. 2278-2282.
- 65) URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 64, p. 99 – 104, 2001.
- 66) VANQUERP, V., RODRIGUEZ, C., COIFFARD, C. *et al.* High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. *J. Chromatogr. A*, n.832, p.273 –277, 1999.
- 67) WADE, A.; WELLER, P.J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Ed.2 Washington: American Pharmaceutical Press, 1994. p. 47 e 238.
- 68) WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POÓR, I., NADERI, L. *et al.* Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B*, vol.63, p. 41-51, 2001.

9 Apêndice

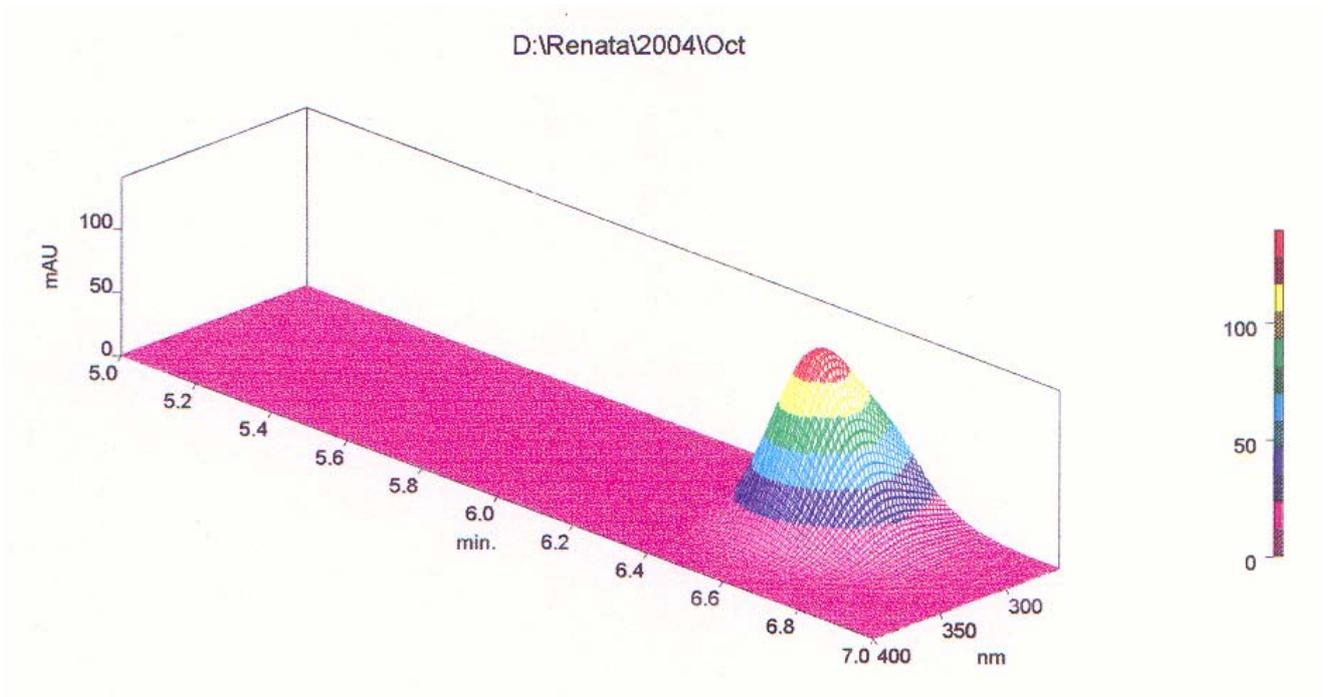
9.1 GRÁFICO 3D BENZOFENONA-3 (BZ3)



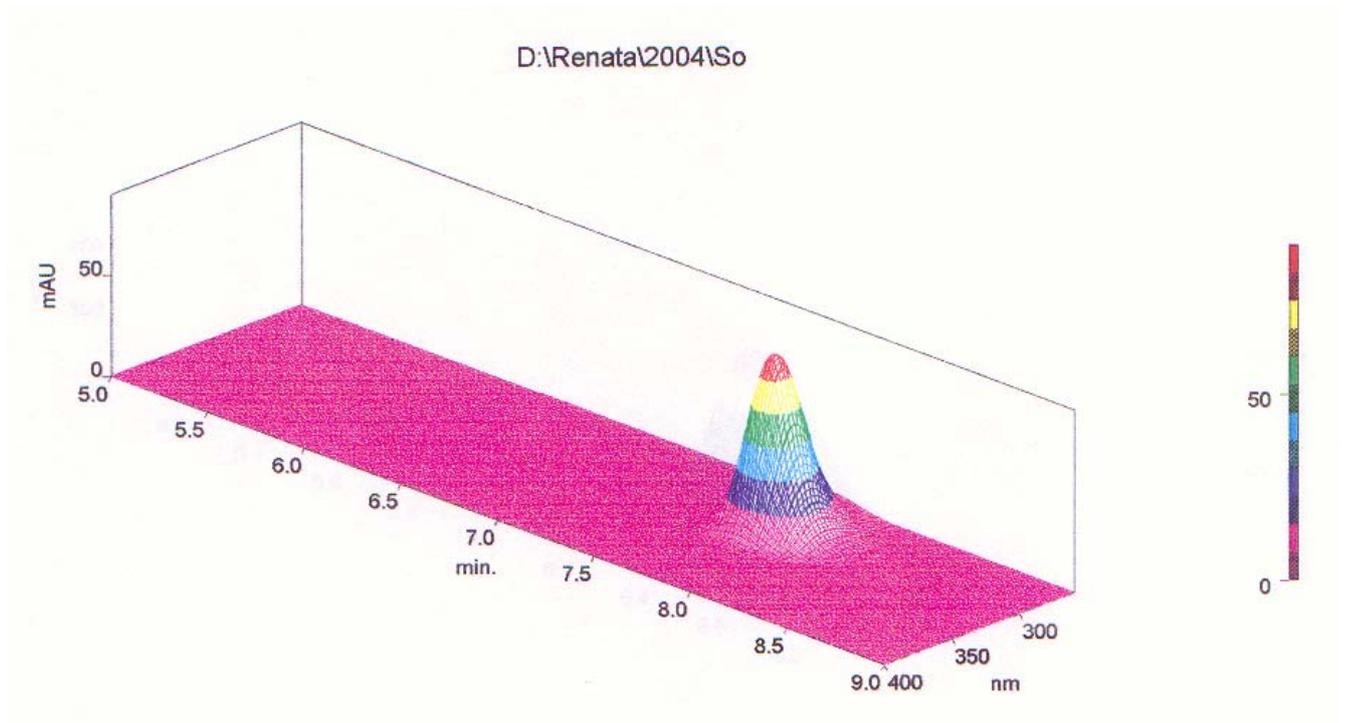
9.2 GRÁFICO 3D AVOBENZONA (AVO)



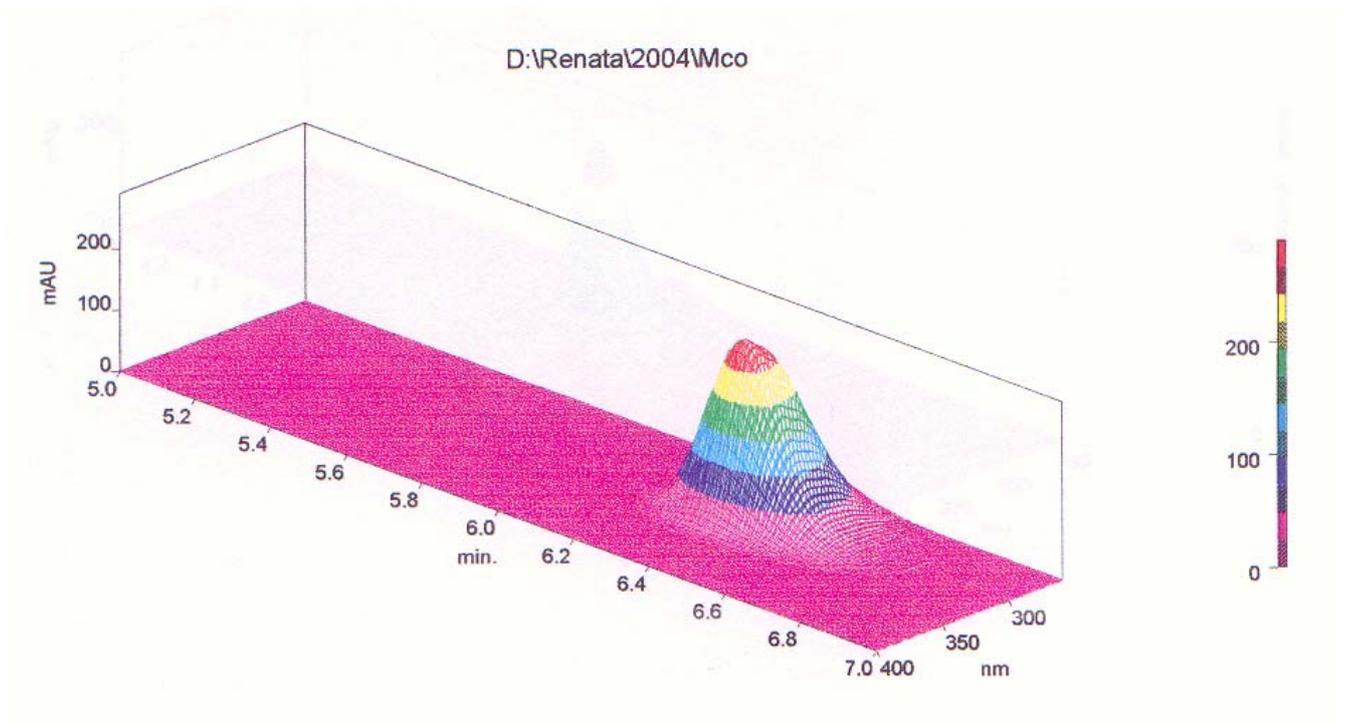
9.3 GRÁFICO 3D OCTOCRILENO (OCT)



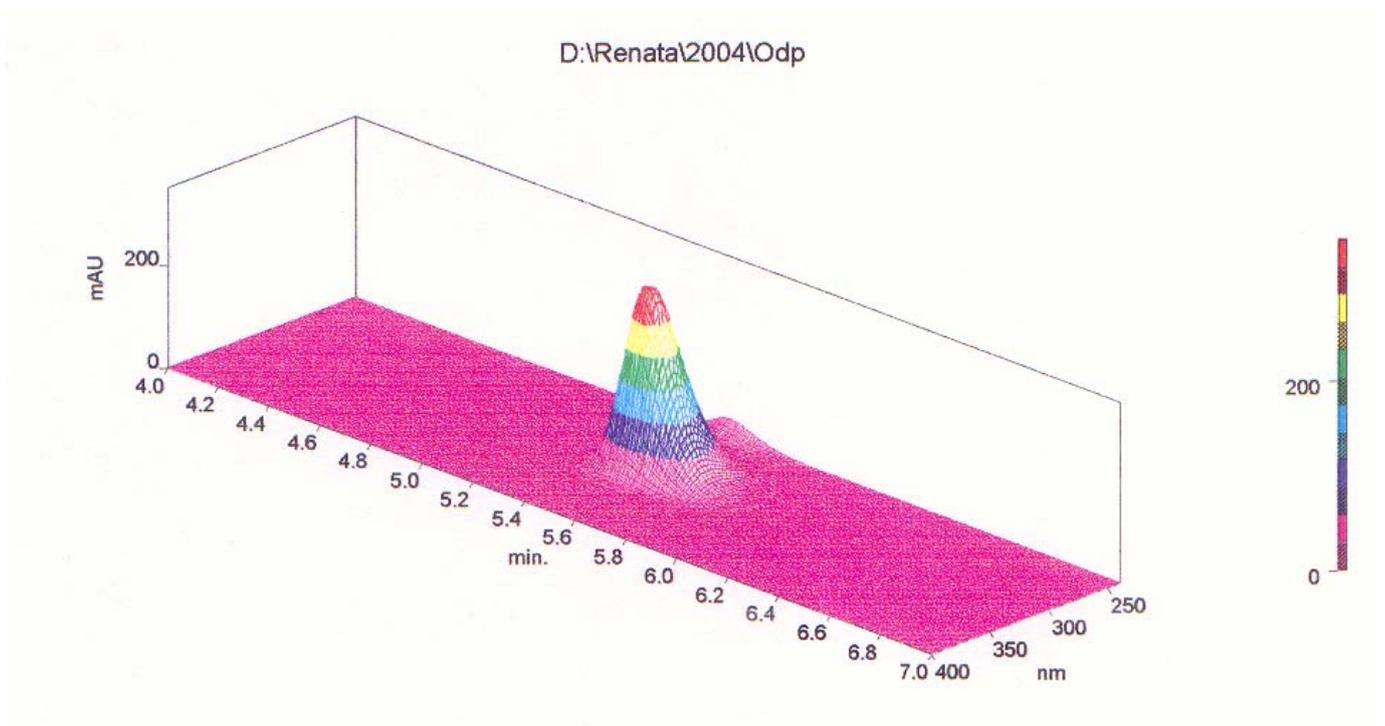
9.4 GRÁFICO 3D SALICILATO DE OCTILA (SO)



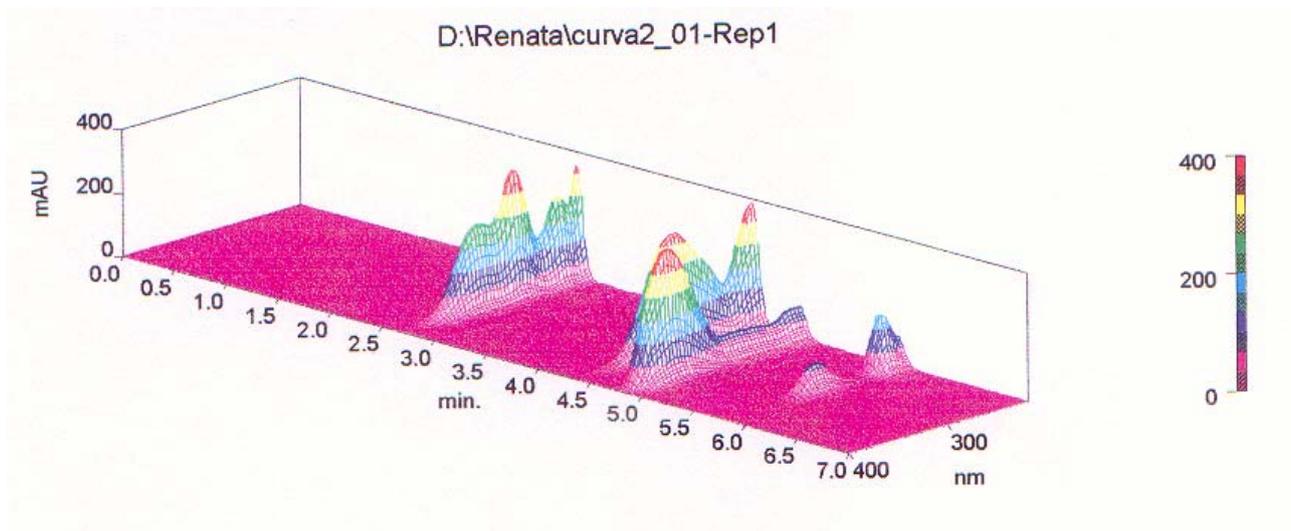
9.5 GRÁFICO 3D p-METOXICINAMATO DE OCTILA (MCO)



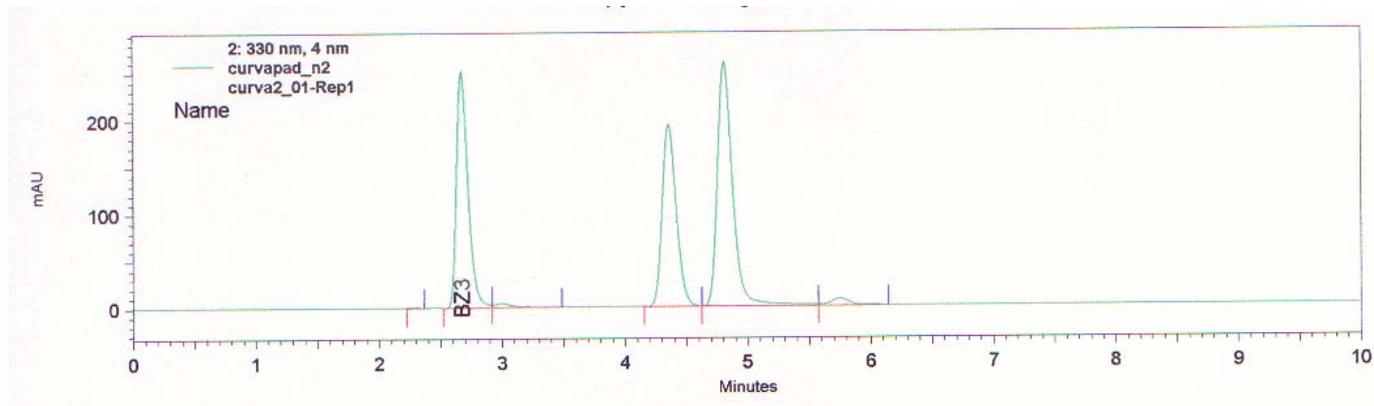
9.6 GRÁFICO 3D OCTIL DIMETIL PABA (ODP)



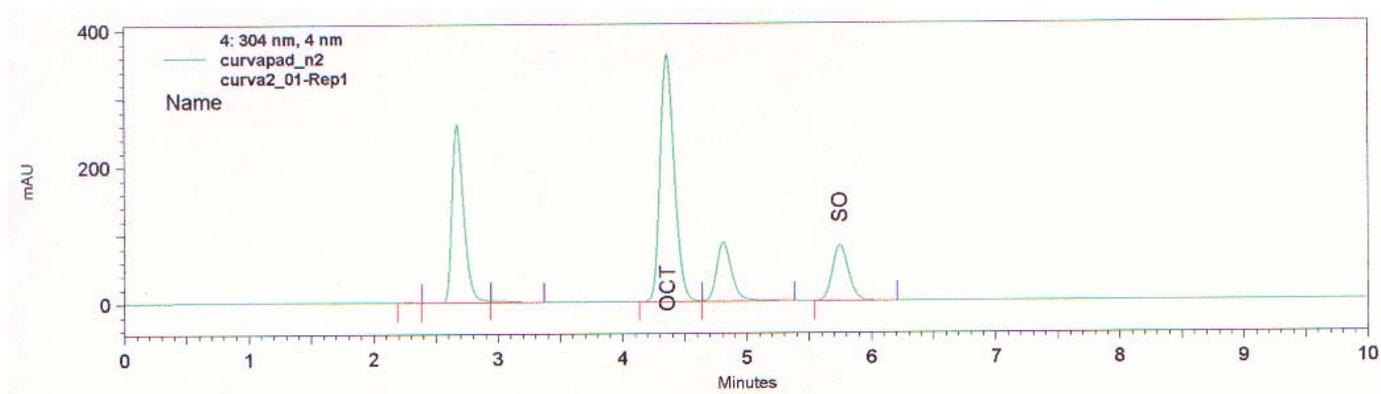
9.7 CROMATOGRAMAS DA MISTURA DOS FILTROS SOLARES BZ3, AVO, OCT E SO PELO MÉTODO I



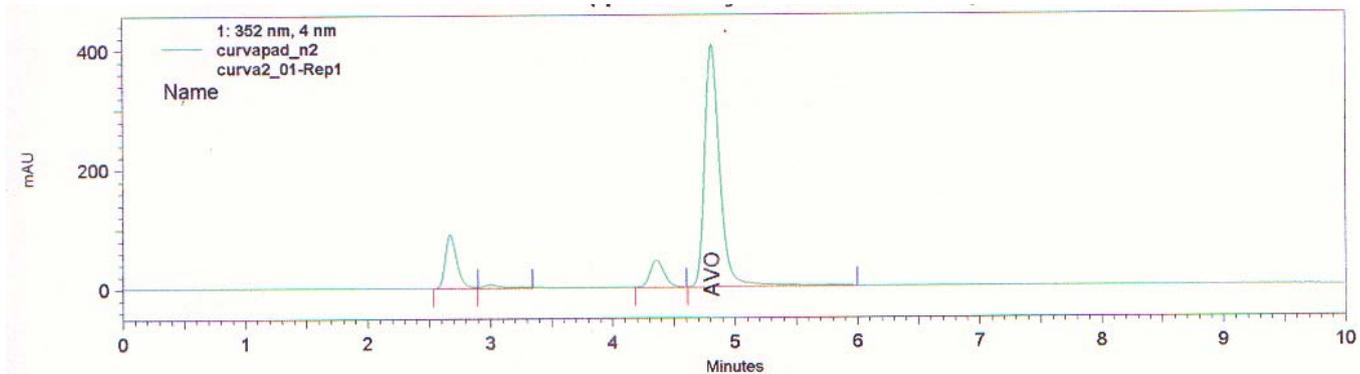
- CROMATOGRAMA EM 330 nm (quantificação da benzofenona-3)



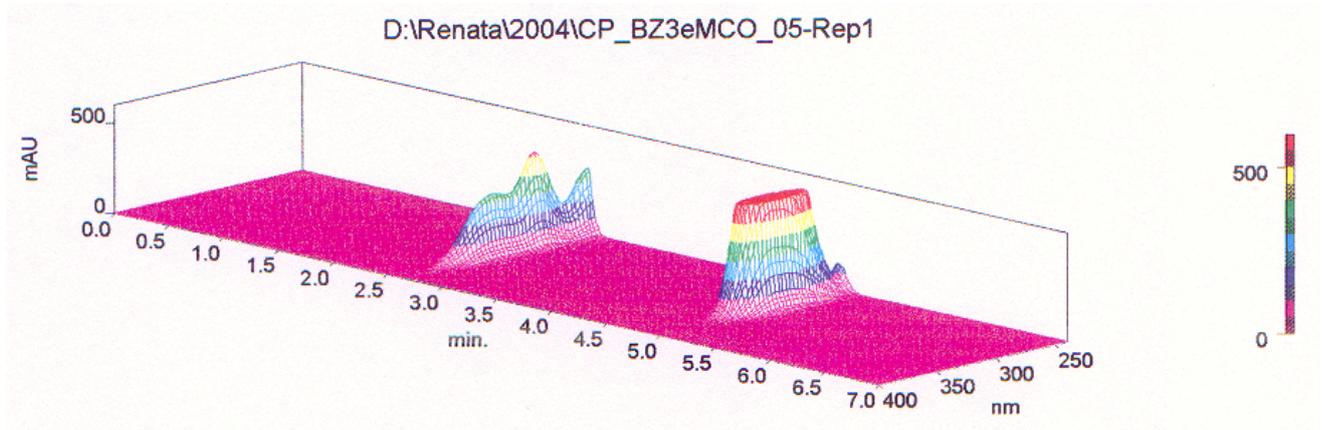
- CROMATOGRAMA EM 304 nm (quantificação do octocrileno e salicilato de octila)



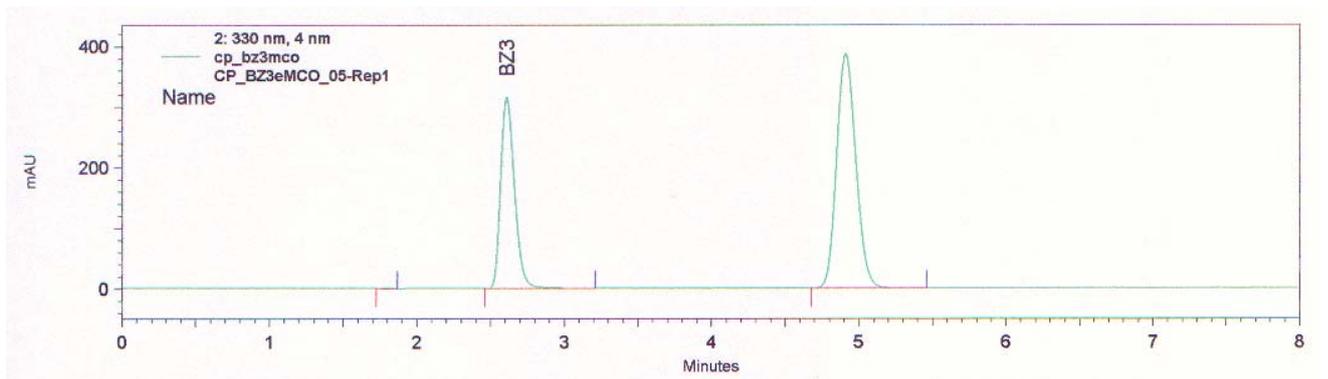
- CROMATOGRAMA EM 352 nm (quantificação da avobenzona)



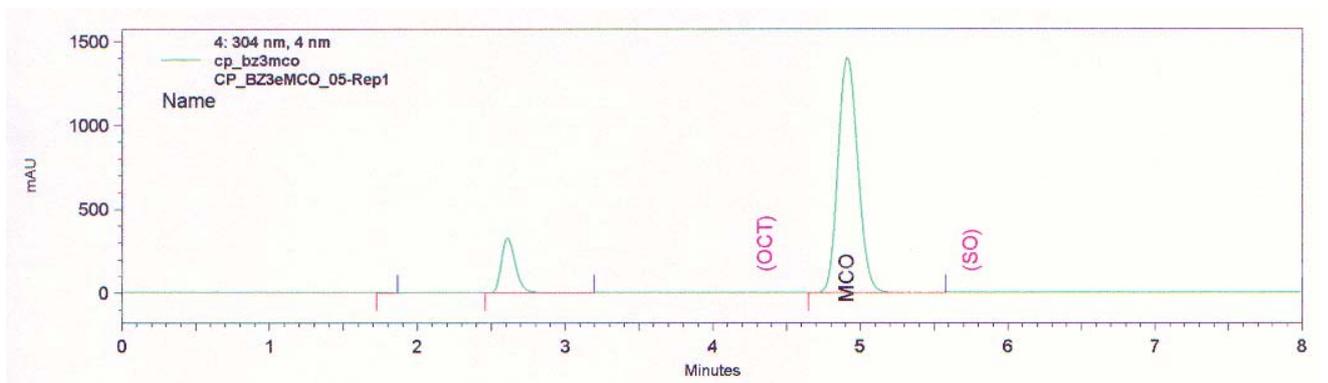
9.8 CROMATOGRAMAS DA MISTURA DOS FILTROS SOLARES BZ3 E MCO PELO MÉTODO I



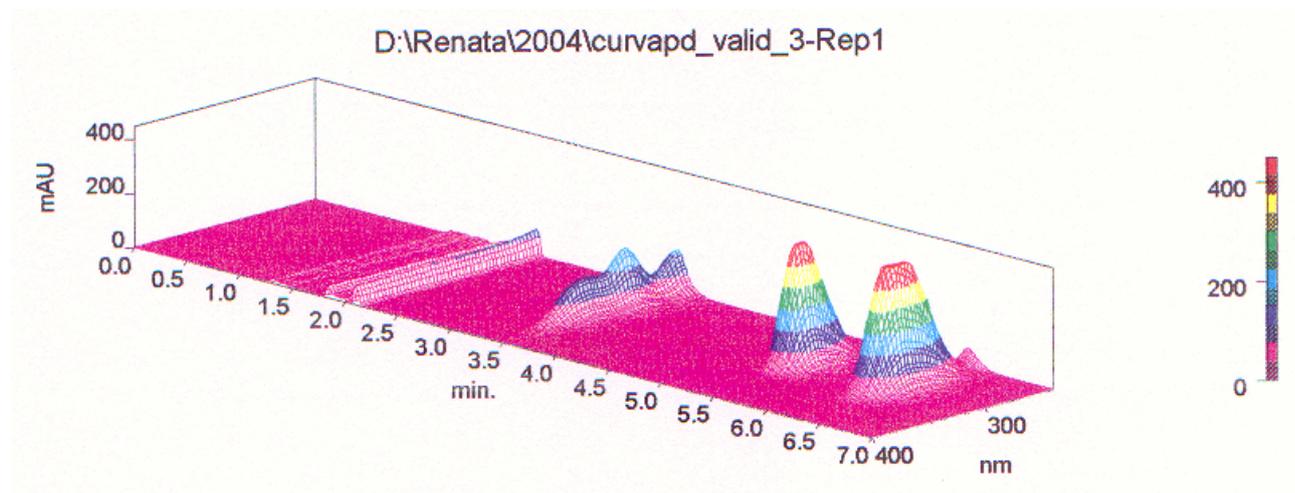
- CROMATOGRAMA EM 330 nm (quantificação da benzofenona-3)



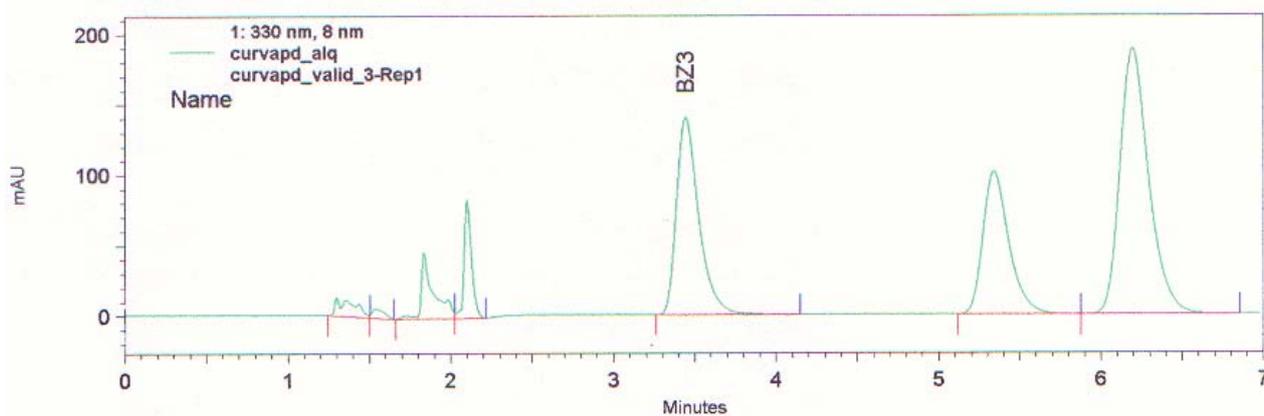
- CROMATOGRAMA EM 304 nm (quantificação do *p*-metoxicinamato de octila)



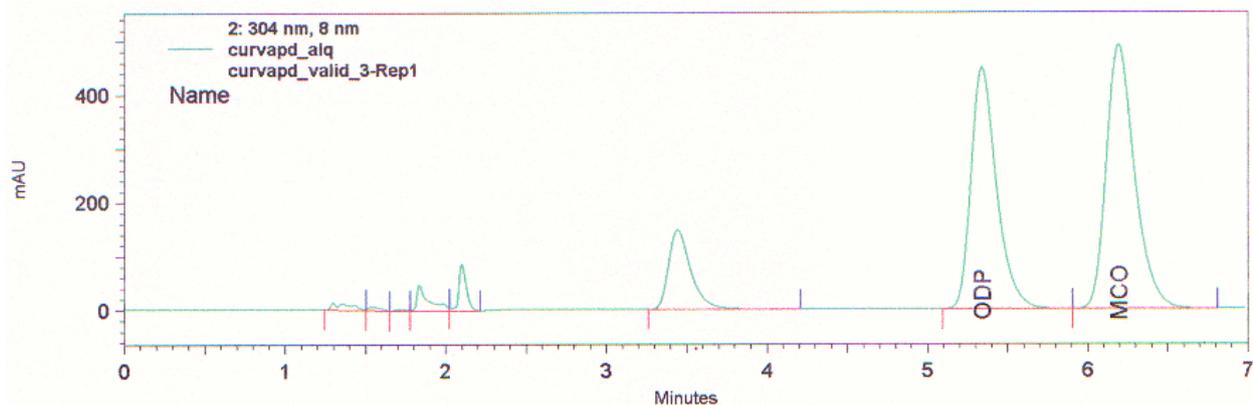
9.9 CROMATOGRAMAS DA MISTURA DOS FILTROS SOLARES BZ3, ODP E MCO PELO MÉTODO II



- CROMATOGRAMA EM 330 nm (quantificação da benzofenona-3)



- CROMATOGRAMA EM 304 nm (quantificação do octil dimetil PABA e *p*-metoxicinamato de octila)



9.10 CÁLCULO TEÓRICO DO FPS DE FORMULAÇÕES

- TABELA DE CONCENTRAÇÃO X FPS (baseadas em BARTH et al, 1999):

Filtro solar	Concentração	Contribuição ao FPS (para emulsões)
MCO	4%	6,0
	7%	10,3
ODP	2%	3,6
	7%	11,7
BZ3	0,5%	0,4
	2%	1,6
	3%	2,4
OCT	10%	7,0

- CÁLCULO DO FPS TEÓRICO DAS FORMULAÇÕES "B", "E", "G", "H", "I" E "L":

Formulação	Composição		FPS	
	Declarada	Declarado	Cálculo teórico do FPS	
B	AVO – 3% OCT – 10%	15	7,0 (referente ao OCT)*	
E	BZ3 – 2% OMC – 7%	8	1,6 + 10,3 = 11,9	
G	BZ3 – 0,5% OMC – 4%	4	0,4 + 6,0 = 6,4	
H	MCO – 6,95%	8	10,3	
I	ODP – 1,99% MCO – 6,95% BZ3 – 2,96%	15	3,6 + 10,3 + 2,4 = 16,3	
L	ODP – 6,92% MCO – 6,95% BZ3 – 2,96%	30	11,7 + 10,3 + 2,4 = 24,4	

*Observação: No trabalho de Barth (BARTH *et al*, 1999), não foi avaliado o FPS do filtro solar butil metóxi dibenzoil metano (avobenzona) pois trata-se de um composto que

absorve a energia na faixa do UVA (vide apêndice 9.2) e, para o cálculo do FPS, considera-se apenas a faixa UVB. Isto ocorre também com os testes oficiais (métodos in vivo) que avaliam o FPS irradiando-se as costas de voluntários com lâmpadas que emitem radiações na faixa do UVB. Não existe ainda uma metodologia oficial para análise da eficácia na região do UVA para a ANVISA e FDA, a recomendação é apenas que se avalie esta proteção com uma metodologia validada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

10 Anexos

TRABALHOS EM CONGRESSOS