



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Caroline Matos Ribeiro

**DETERMINAÇÃO DE FPS POR MÉTODO *IN VITRO*: ABSORBÂNCIA X
REFLECTÂNCIA**

BRASÍLIA- DF

2018

Caroline Matos Ribeiro

**DETERMINAÇÃO DE FPS POR MÉTODO *IN VITRO*: ABSORBÂNCIA X
REFLECTÂNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) de Graduação em Farmácia apresentado na Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo

Co-orientador: Prof. Me. Diegue Henrique Nascimento Martins

BRASÍLIA-DF

2018

Caroline Matos Ribeiro

**DETERMINAÇÃO DE FPS POR MÉTODO *IN VITRO*: ABSORBÂNCIA X
REFLECTÂNCIA**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

BRASÍLIA-DF

2018

AGRADECIMENTOS

Depois de muito trabalho, gostaria de agradecer primeiramente a Deus e à toda a equipe espiritual que me acompanha em todos os meus passos, sem Ele e essa equipe eu não conseguiria caminhar em passos firmes.

Quero agradecer imensamente a meus pais Franzé Ribeiro e Katarina Matos, que me deram sempre todo o apoio, todo o incentivo e todo o amor possível e são os melhores pais que eu poderia ter. Sem vocês eu não seria quem eu sou hoje. Além deles, sou grata à minha irmã cientista Isadora Ribeiro que me entende, que aguentou também meus choros e sempre me incentiva a continuar a caminhada; e à minha sobrinha, uma das minhas recentes alegrias, que me tirava do estresse, fazendo com que eu desse uma pausa na escrita.

Agradeço especialmente à minha orientadora Yris Fonseca, que gentilmente me aceitou como aluna de TCC e esteve sempre disposta a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas; e ao meu co-orientador Diegue Martins, meu norte dentro do laboratório, que me ajudou em todas as etapas do trabalho e estava sempre me incentivando a não desanimar porque daria tudo certo no final. Aproveito para agradecer ao pessoal do laboratório, especialmente Samuel Cardoso e Kellen Cruvinel, que ficaram até tarde na UnB me ajudando a fazer com que a formulação desse certo.

Sou grata também por ter amigos de curso tão maravilhosos que me ajudaram durante todo o período da graduação, sempre compartilhando experiências, me dando apoio, estudando junto, me consolando, chorando junto, me dando conselhos, me fazendo rir até doer a barriga ou simplesmente me ouvindo: Ana Júlia Barbosa, Beatriz Itai, Beatriz Ulian, Camila Letícia Ferreira, Gabriel de Campos, Igor Saiki, Ísis de Araujo, Mariane Vieira, Victor Hugo Bezerra e Victória Baggi.

Agradeço também aos meus amigos do colégio que estão em minha vida até hoje e também são meus verdadeiros parceiros Andressa Rosa, Débora Saraiva, Eduardo Moresi e Pedro Henrique Rosa.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos meus amigos da Mocidade da Comunhão Espírita, que entenderam algumas ausências nesse semestre, aguentaram meus choros, desesperos, e me acalmaram, aliviando meu estresse da semana nos meus dias de sábado. Agradeço especialmente a Brenda Teixeira, Celeste, Deborah Sousa, Gabriel Bastos, Jade Gabriela, Lucas Rangel, Mariza Tabosa, Mateus Marques, Murilo e Sarah Barreto que me deram grande apoio e fizeram tudo ficar mais leve. Levo todos comigo.

Amo todos vocês, obrigada por tudo. Sem todos vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do método de solubilidade II Erro! Indicador não definido.	
Figura 2:Imagens exemplo do teste COLIPA.....	31
Figura 3: Aparência do protetor solar B obtido utilizando o solvente etanol.....	37
Figura 4: Diferença na presença de partículas de fundo e turbidez nas diluições de protetores solares.	40
Figura 5: Exemplo da aparência das diluições feitas utilizando como base o método de solubilidade II.	41
Figura 6: Comparação das metodologias de Mansur e COLIPA	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação e descrição das formulações utilizadas nos ensaios para determinação de FPS.....	21
Tabela 2: Relação entre os comprimentos de onda e a multiplicação do efeito eritematogênico pela intensidade solar.....	27
Tabela 3: Componentes da formulação-base para o creme 8% de homosalato.....	28
Tabela 4: Avaliação do FPS com modificações segundo método de solubilidade I.....	34
Tabela 5: Avaliação do FPS do protetor solar B seguindo o método de solubilidade II com modificações.....	38
Tabela 6: Avaliação do FPS dos protetores solares seguindo o método de solubilidade II e utilizando isopropanol, sem filtração.....	39
Tabela 7: Avaliação do FPS pelo método COLIPA (2011)	44

LISTA DE SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

COLIPA: *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (Associação Europeia da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria)

DME: Dose Mínima Eritematosa

DMEnp: Dose mínima eritematosa na mesma pele não protegida por um protetor solar

DMEp: Dose mínima eritematosa na pele protegida por um protetor solar

DMP: Dose Mínima Pigmentária

DMPp: Dose mínima pigmentária na pele protegida por um protetor solar

DMPnp: dose mínima pigmentária na mesma pele não protegida por um protetor solar

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EE: Efeito Eritematogênico

FC: Fator de Correção

FDA: *Food and Drug Administration*

FPS: Fator de Proteção Solar

FPUVA: Fator de Proteção da Radiação Ultravioleta A

I: Intensidade da luz/irradiância da fonte Ultravioleta

INCA: Instituto Nacional do Câncer

PMMA: *Poly(methyl methacrylate)* / Polimetilmetacrilato

PROTESTE: Associação Brasileira de Defesa do Consumidor

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SPF: *Sun Protection Factor*

UV: Radiação Ultravioleta

UVA: Radiação Ultravioleta A

UVB: Radiação Ultravioleta B

UVC: Radiação Ultravioleta C

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Radiação solar.....	11
1.2. Efeitos maléficos da radiação solar para a pele	12
1.3. Uso de protetor solar.....	13
1.4. Composição dos protetores solares (filtros orgânicos x filtros inorgânicos).....	13
1.5. Fator de Proteção Solar e a eficácia dos protetores solares	16
1.6. Determinação do FPS no âmbito internacional e nacional	17
1.7. Objetivos.....	20
1.7.1. <i>Objetivo geral</i>	20
1.7.2. <i>Objetivos específicos</i>	20
2. METODOLOGIA.....	21
2.1. Determinação de FPS por métodos de espectrofotometria de absorvância	23
2.1.1. <i>Método de solubilidade I para a determinação de FPS</i>	23
2.1.2. <i>Método de solubilidade II para a determinação de FPS</i>	24
2.1.3. <i>Cálculos do FPS baseados em Mansur</i>	26
2.1.4. <i>Teste com o padrão</i>	27
2.2. Determinação de FPS por método de espectrometria de reflectância.....	29
2.2.1. <i>Metodologia COLIPA</i>	29
2.3. Comparação das metodologias de determinação de FPS por absorvância e por reflectância.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Determinação de FPS por métodos de espectrofotometria de absorvância	33
3.1.1. <i>Método de solubilidade I para a determinação de FPS</i>	34
3.1.2. <i>Método de solubilidade II para a determinação de FPS</i>	36
3.2. Determinação de FPS por método de espectrofotometria de reflectância	43
3.3. Comparação das metodologias de determinação de FPS por absorvância e por reflectância.....	46
4. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Protetores solares são produtos cosméticos de suma importância e previnem uma série de danos que podem ser causados na pele das pessoas. FPS é o fator de proteção solar que indica o quanto a formulação fotoprotetora é capaz de proteger um indivíduo da radiação ultravioleta e normalmente é determinado a partir de testes realizados *in vivo* em seres humanos, a partir da obtenção da dose eritematosa mínima. A fim de obter uma rapidez maior na realização dos testes, menor custo e menor demanda de profissionais, além de redução dos riscos de queimadura nos voluntários humanos submetidos aos testes *in vivo*, surge a necessidade da utilização de métodos *in vitro* como forma de primeira análise de FPS. Assim, foram testadas e comparadas as metodologias *in vitro* de Mansur (1986) e COLIPA (2011) para determinação do FPS de formulações comercializadas no Distrito Federal. Foram testadas 5 formulações pelo método de Mansur e 3 pelo método COLIPA. Os resultados pelo método de Mansur foram invalidados pelo teste com o padrão homosolato 8%, que se encontrou abaixo do preconizado pelo FDA. A metodologia Mansur apresentou dificuldades de solubilização da amostra e FPS consideravelmente abaixo do rotulado com a aplicação de dois métodos de solubilidade distintos e com a utilização de solventes diferentes. Os resultados de FPS para as amostras usando essa metodologia foram de 4,54; 6,31 e 6,32 para três amostras de protetores com FPS rotulado de 30, utilizando o método de solubilidade I; 6,46 e 6,34 para protetores com FPS rotulado de 30, utilizando o método de solubilidade II com o solvente etanol; 6,55; 6,99; 6,67 e 6,90 para quatro amostras de protetores com FPS rotulado de 30 e 11,54 para o protetor com FPS rotulado 50, utilizando o método de solubilidade II com o solvente isopropanol. O método COLIPA se mostrou mais eficiente nos testes, apesar de ter apresentado resultados abaixo do fator de proteção que constava na embalagem (14,92 para o protetor com FPS rotulado 30 e 31,80 para o de FPS rotulado 50). Apresentou também um FPS de 39,64 para uma formulação de FPS 30 rotulado. A metodologia de COLIPA se mostrou melhor do que a metodologia de Mansur para ser utilizada em testes *in vitro* de determinação do FPS, porém são necessários mais estudos para que possa haver mais confiabilidade nesse teste e para que se obtenha resultados ainda mais próximos do real.

Palavras-chave: FPS. Teste *in vitro*. Mansur. COLIPA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radiação solar

A radiação solar é aquela emitida pelo sol, que é formada por diversos espectros, porém há três tipos principais que atingem a terra: a radiação infravermelha, a luz visível e a radiação ultravioleta. Elas representam respectivamente cerca de 50%, 40% e 10% do total da radiação que chega à superfície do planeta (SCHALKA et al., 2014).

Radiação ultravioleta, segundo a definição da ANVISA na RDC N° 30/2012 trata-se da radiação emitida pelo sol que compreende o espectro eletromagnético de 200 a 400 nm e está classificada em três tipos: ultravioleta A (UVA, encontra-se na faixa de 320 a 400 nm), ultravioleta B (UVB, faixa de 290 a 320 nm), e a ultravioleta C (UVC, faixa de 200 a 290 nm) (BRASIL, 2012).

A intensidade (energia) das radiações é inversamente proporcional ao tamanho do comprimento de onda, portanto, radiações com comprimentos de onda menores possuem um maior potencial de causar danos. Assim, a radiação UVC seria a mais prejudicial, porém ela é detida pela camada de ozônio (FLOR e DAVOLOS, 2007).

A radiação UVB possui uma maior energia que a UVA e é em sua maioria retida na camada de ozônio, mas parte dela consegue atravessar e penetrar a epiderme, causando danos mais visíveis à pele e em um menor tempo (danos agudos), bem como danos crônicos. Ela provoca vermelhidões, queimadura solar, mas também é conhecida por ter uma forte correlação com o aparecimento de câncer de pele, pois pode provocar danos no DNA (MELO e RIBEIRO, 2015). Esses danos são causados pela interação desta radiação com o material genético, gerando mutações como dímeros de pirimidina, relacionadas ao câncer de pele não melanoma. A UVB também pode colaborar para o aparecimento de fotodermatoses (BALOGH et al., 2011).

A radiação UVA é a que tem uma menor absorção na atmosfera e, portanto, é a que mais atinge a superfície da terra, representando cerca de 95% da radiação UV que chega ao planeta (FLOR e DAVOLOS, 2007). Embora ela não cause um dano imediato e visível na pele, essa radiação consegue penetrar mais fundo, podendo chegar à derme, contribuindo para a formação de uma série de danos causados pelo sol. Assim, a UVA é responsável por danos crônicos e gradativos a pele, induzindo o envelhecimento precoce por provocar a formação de espécies reativas de oxigênio (MELO e RIBEIRO 2015). Além disso, ela é causadora de imunossupressão e também contribui para o desenvolvimento de câncer de pele (MATTS et al., 2010).

1.2. Efeitos maléficos da radiação solar para a pele

A falta da utilização de protetores solares pelos brasileiros é a principal causa do aumento da ocorrência de câncer de pele na população. Dados divulgados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão auxiliar em ações de prevenção e controle de câncer no Brasil, mostram que para o ano de 2018 foram estimados 165.580 novos casos de câncer não melanoma, o tipo mais frequente de câncer no país (30%). Esse tipo de câncer se desenvolve principalmente em pessoas de pele clara, com maior sensibilidade à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias (INCA, 2018).

A fim de diminuir esses casos de câncer de pele, é necessário que haja fotoproteção, que segundo o Consenso Brasileiro de Fotoproteção da Sociedade Brasileira de Dermatologia, engloba uma série de medidas tomadas para diminuir a exposição aos raios solares e prevenir danos agudos e crônicos à pele. Dentre essas medidas de fotoproteção, há a proteção pela utilização de roupas e acessórios, a proteção por meio de janelas de vidro e coberturas e a proteção pelo uso de filtros solares ou protetores (SCHALKA et al., 2014).

A utilização de protetores solares é a principal medida cosmética usada para reduzir esses efeitos danosos da radiação UV na pele (BALOGH et al., 2011). A RDC N°. 30 de 2012 da ANVISA definiu protetor solar como:

“Qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação” (BRASIL, 2012).

1.3. Uso de protetor solar

Embora haja evidências dos danos causados pela radiação UV, muitas pessoas ainda não utilizam protetores solares. Uma pesquisa realizada em 2015 nos Estados Unidos mostrou que a grande maioria da população do país não usa. Apenas 18,8% dos homens e 42,6% das mulheres utilizavam protetor solar no rosto e 19,9% dos homens e 34,4% das mulheres passavam em outras partes expostas da pele (HOWMAN, 2016).

No Brasil, embora seja um país que por sua localização recebe uma incidência de raios solares maior, o cenário não é muito diferente. Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, apenas 30% da população do país aplica protetor solar diariamente (MELO; RIBEIRO, 2015).

1.4. Composição dos protetores solares (filtros orgânicos x filtros inorgânicos)

O protetor solar contém em sua formulação uma combinação de filtros solares que irão realizar o papel de proteção, sendo eles moléculas ou complexos de moléculas que absorvem, refletem ou dispersam a radiação UV (BALOGH et al., 2011). Esses filtros podem ser orgânicos ou inorgânicos dependendo da forma que eles atenuam essa radiação (GONTIJO, 2009).

Os filtros orgânicos, também chamados de químicos, agem como cromóforos, pois absorvem as radiações UV, vão para o estado excitado e depois retornam ao estado normal, liberando calor e outras formas de energia não danosas à pele. A fotoestabilidade desses filtros (capacidade de absorver radiação repetidas vezes) influencia demasiadamente na sua eficácia (GONTIJO, 2009).

Há três tipos de filtros orgânicos: os que são UVA, os que são UVB e os de amplo espectro, que oferecem proteção contra ambos. Um dos filtros UVB mais potentes cujo uso é permitido no Brasil é o 4-metoxicinamato de 2-etilhexila. Ele pertencente a classe dos cinamatos, absorve a radiação entre 270-328 nm e é popular na Europa e nos EUA. Outra classe de filtros orgânicos UVB é a dos salicilatos, conhecidos por apresentarem boa segurança, estabilidade, e serem insolúveis em água (não diminuem a eficácia deles em contato com a água). Os filtros dessa classe absorvem entre 290-315 nm, e um dos representantes dela é o salicilato de homomentila (homosalato) (BALOGH et al., 2011). Esse filtro é muito utilizado nas formulações, servindo inclusive como padrão em testes de determinação de FPS *in vitro* (Fator de Proteção Solar) (MANSUR et. al., 1986a).

Um dos filtros UVA mais utilizados nas formulações é o ácido tereftalideno, que absorve entre 290 e 390 nm. Esse filtro é fotoestável e protege contra o fotoenvelhecimento (BALOGH et al., 2011).

Os filtros inorgânicos também são chamados de físicos por formarem uma barreira na superfície da pele, impedindo a passagem dos raios solares. Eles apresentam grande eficácia e não são sensibilizantes, sendo mais indicados para indivíduos alérgicos ou de pele sensível (CABRAL, 2013). Eles podem refletir, dispersar ou absorver as radiações UV, conforme o tamanho de suas partículas (GONTIJO, 2009).

Os filtros formados por partículas grandes (200 a 500 nm) refletem e por isso são bastante eficazes na proteção, apesar de terem menor aceitação do público (GONTIJO,

2009). Essas características que os deixam com menor aceitabilidade do público são a permanência de uma coloração esbranquiçada e opaca na pele após aplicação, transferência da formulação para as roupas com conseqüente perda do produto e diminuição da fotoproteção no local, e maior capacidade de causar hiperqueratinização folicular na pele (BALOGH et al., 2011). Porém, como essas partículas são grandes, normalmente não penetram na pele, ficam no estrato córneo e são eliminadas com a descamação normal da pele, sendo então menos alergênicos (BAILLO, 2012).

Já os filtros formados por partículas pequenas (10 a 50 nm), dispersam ou absorvem a radiação e por isso são menos eficazes contra a radiação UVA. Além disso, partículas menores costumam formar mais agregados, diminuindo assim a fotoproteção; embora esse problema seja possível de ser resolvido com a adição de compostos como a sílica para manter a dispersão das partículas (GONTIJO, 2009). Essa diminuição da fotoproteção pela formação de agregados se dá porque as micropartículas não devem absorver nem espalhar a radiação visível, e sim apenas a radiação UV (FLOR, 2007), porém a formação de agregados pode provocar um aumento na difração e reflexão da faixa de luz visível pelas partículas, diminuindo sua eficácia contra a radiação UV (SURMAN, 2008). Ademais, essas nanopartículas possuem a capacidade de serem absorvidas pela pele porque são muito pequenas, o que facilita seu acesso à corrente sanguínea e permite o atravessamento de membranas biológicas, podendo causar agregação de proteínas e até mesmo induzir a formação de radicais livres (BAILLO, 2012). Apesar dos problemas, esses filtros são cosmeticamente melhores do que os de partículas grandes, possuindo maior aceitação do público por ficarem transparentes após aplicação (BALOGH et al., 2011).

1.5. Fator de Proteção Solar e a eficácia dos protetores solares

A eficácia dos protetores solares é medida pelo FPS (Fator de Proteção Solar). Segundo a RDC N°. 30 de 2012 da ANVISA, ele é definido como o “valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa (que causa rubor), em uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEnp)”. A dose mínima eritematosa (DME), também definida na mesma resolução, é “dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta, de acordo com a metodologia adotada” (BRASIL, 2012).

Esse fator de proteção solar, porém, está mais relacionado com a radiação UVB, a que provoca queimaduras solares na pele. Durante vários anos, a proteção contra esse tipo de radiação era suficiente para uma formulação de protetor solar. Com a descoberta de que a radiação UVA, ainda que a longo prazo, provocava também danos na pele dos indivíduos, os órgãos tanto internacionais quanto nacionais passaram a exigir também a proteção contra os raios UVA para o registro e comercialização da formulação (MOURA, 2012).

O fator de proteção UVA (FPUVA), segundo a definição contida na RDC N°. 30 de 2012 da ANVISA, é o “valor obtido pela razão entre a dose mínima pigmentária em uma pele protegida por um protetor solar (DMPp) e a dose mínima pigmentária na mesma pele, quando desprotegida (DMPnp)”. A dose mínima pigmentária, segundo a mesma resolução, é “dose mínima de radiação UVA requerida para produzir um escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas claramente definidas, observado entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA” (BRASIL, 2012).

Baseando-se então nas informações da ANVISA, dose mínima eritematosa e dose mínima pigmentária são conceitos distintos. O primeiro se relaciona com as queimaduras solares provocadas pela radiação UVB (vermelhidões), que demoram mais tempo para

aparecerem, enquanto que o segundo se relaciona com o escurecimento pigmentário persistente da pele provocado pelas radiações UVA, mais conhecido como bronzeamento, que leva menos tempo para aparecer. Esse escurecimento é formado devido a foto-oxidação da melanina pré-formada (SCHALKA, 2008).

1.6. Determinação do FPS no âmbito internacional e nacional

Em 1978 foi proposto, pela agência regulatória norte-americana (*Food and Drug Administration* - FDA), o primeiro método para a determinação do fator de proteção solar. Tratava-se de um método *in vivo*, e o FPS era obtido utilizando o cálculo da dose eritematosa mínima, cujo resultado era adquirido por meio de um teste realizado com voluntários. No experimento, eles eram expostos à radiação artificial com parte da pele protegida pelo protetor solar e parte não, sendo visto o tempo de formação de eritema. Após a divulgação dessa metodologia, outras foram propostas também por diferentes agências, como a alemã *Deutsches Institut für Normung* (DIN), que publicou a norma DIN 67501, uma versão diferente da que havia sido proposta pela FDA, tendo como principais diferenças a quantidade de protetor aplicada na pele e a lâmpada utilizada para emissão de radiação (era utilizada pelo FDA a lâmpada de arco xenônio, cuja faixa de radiação UV era de 160 a 380nm, e pela DIN era proposta a utilização da luz natural ou lâmpada de mercúrio, cujas principais linhas de emissão na faixa UV são 184,4nm e 254nm, sendo UVC e 365nm, sendo UVA) (SCHALKA, 2011).

Em 1993 a FDA divulgou uma proposta de monografia, mas apenas em 1999 ela publicou a monografia final intitulada “*Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use; Final Monograph*” descrevendo quais os testes que deveriam ser realizados para a avaliação da eficácia dos protetores solares. Em 2011, a agência publicou uma revisão

e complementação dos testes intitulada “*Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use*” (SCHALKA, 2011).

Além do FDA, outras agências regulatórias e instituições como a *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (Associação Europeia da Indústria de Cosméticos, Higiene Pessoal e Perfumaria - COLIPA), propuseram metodologias. Em 2006 foi publicada uma monografia intitulada “*International Sun Protection Factor (SPF) Test Method*” (SCHALKA, 2011).

Fora do Brasil, recentemente, as análises de FPS são feitas utilizando tanto métodos *in vivo* quanto métodos *in vitro*. Os documentos mais recentes da ISO (Organização Internacional para Padronização) que tratam da metodologia dos testes são o ISO 24444, publicado em 2010, cujo título é “*Sun protection test methods: In vivo determination of the sun protection factor (SPF)*” e a ISO/TR 26369, publicada em 2009 cujo título é “*Sun protection test methods - Review and evaluation of methods to assess the photoprotection of sun protection products*”, com a presença de vários métodos *in vitro* e *in vivo* de vários países no documento.

Atualmente, no Brasil, para a determinação do FPS das formulações, são aceitos somente métodos *in vivo*, segundo a RDC nº 30 de 1 de junho de 2012, que aprova o regulamento técnico do Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências. Nessa resolução consta que são permitidas apenas as metodologias presentes na monografia do FDA de 1999 e suas atualizações posteriores e as constantes na monografia do COLIPA de 2006 e suas atualizações. Nenhum método *in vitro* é considerado pela ANVISA para determinação do fator de proteção solar, nem mesmo a metodologia *in vitro* desenvolvida pela COLIPA. Já para a determinação do nível de proteção UVA, a agência regulatória brasileira coloca, na mesma resolução mencionada, que aceita um método *in vivo* descrito pela European Commission publicado em 1995 intitulado “*Standardization*

Mandate Assigned to CEN Concerning Methods for Testing Efficacy of Sunscreen Products -2006 Annex 2 - Determination of the UVA protection factor based on the principles recommended by the Japanese Cosmetic Industry Association”, e uma metodologia *in vitro* proposta por COLIPA publicada em 2009 intitulada “*In Vitro Method for the Determination of the UVA Protection Factor and "Critical Wavelength" Values of Sunscreen Products*” (BRASIL, 2012).

Os métodos de determinação de FPS e de fator de proteção UVA *in vivo* demandam que haja uma seleção de voluntários (que pode envolver mais tempo e maior complexidade), uma equipe de médicos, mão de obra mais especializada para comandar os testes, equipamentos mais dispendiosos e maior custo total para a realização dos testes (VELASCO et al., 2010).

Levando em consideração a informação de que no Brasil só há a aceitação de metodologias *in vivo* para a determinação do FPS e visando uma menor utilização de animais em testes, bem como uma rapidez maior na realização desses, menor custo e menor demanda de profissionais, além de redução dos riscos de queimadura nos voluntários humanos submetidos aos testes *in vivo*, surge a necessidade da utilização de métodos *in vitro* como forma de primeira análise de FPS.

Esse trabalho surge então com a finalidade de comparar métodos *in vitro* já existentes para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de protetores solares utilizando técnicas envolvendo absorbância e reflectância, a fim de propor a aceitação de um deles por parte de desenvolvedores e fabricantes desses produtos.

Diante de dois métodos *in vitro* de determinação de FPS com fundamentos distintos, surge a necessidade de averiguar qual o melhor método de determinação, considerando reprodutibilidade e precisão das determinações. A determinação do FPS de produtos comerciais pode fornecer informações acerca da qualidade de tais produtos disponíveis para

a população e é importante conferi-lo confrontando o FPS descrito nos rótulos e os determinados experimentalmente de protetores solares adquiridos no comércio farmacêutico do Distrito Federal.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo geral

Comparar os métodos *in vitro* para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) de protetores solares utilizando técnicas envolvendo absorvância e reflectância.

1.7.2. Objetivos específicos

- Determinar o FPS de protetores solares pelo método *in vitro* de Mansur (1986);
- Determinar o FPS de protetores solares pelo método *in vitro* do COLIPA (2011);
- Comparar as metodologias *in vitro* do COLIPA (2011) e de Mansur (1986) para determinação do FPS de protetores solares;
- Comparar o FPS descrito nos rótulos e os determinados experimentalmente de protetores solares adquiridos no comercio farmacêutico do Distrito Federal.
- Obtenção de formulação gel-creme com incorporação de substância com FPS bem definido para melhor avaliação da adequabilidade dos métodos utilizados para a determinação de FPS.

2. METODOLOGIA

As análises do Fator de Proteção Solar das formulações foram realizadas pelos métodos do *COLIPA in vitro* de 2011 e o do Mansur de 1986. Os protetores solares utilizados para os testes foram formulações adquiridas do comércio farmacêutico do Distrito Federal. Foram avaliadas 5 formulações pelo método de Mansur, sendo 2 gel-creme, 2 cremes e 1 loção. Para o método *COLIPA* foram testadas três dessas 5 formulações, sendo 1 gel-creme, 1 creme e 1 loção. Quatro das cinco formulações tinham FPS 30 rotulado (protetores A, B, C e D) e uma tinha FPS 50 (protetor E). Na **Tabela 1** são identificadas e descritas as formulações utilizadas.

Tabela 1: Identificação e descrição das formulações utilizadas nos ensaios para determinação de FPS

Protetor solar	Descrição	Filtros solares presentes	Classificação do filtro
Protetor A	Formulação creme de FPS 30 rotulado	Octocrileno	Químico lipossolúvel UVB
		Salicilato de 2-etilhexila	Químico lipossolúvel UVB
		Avobenzona	Químico lipossolúvel UVA
		Dióxido de titânio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
		Hidróxido de alumínio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
Protetor B	Formulação creme de FPS 30 rotulado	Avobenzona	Químico lipossolúvel UVA
		Octocrileno	Químico lipossolúvel UVB
		Etlhexil triazona	Químico lipossolúvel UVB
		Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	Químico lipossolúvel UVA/UVB
		Dióxido de titânio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
Protetor C	Formulação loção de FPS 30 rotulado	Homosalato	Químico lipossolúvel UVB

		Octocrileno	Químico lipossolúvel UVB
		Salicilato de 2-etilhexila	Químico lipossolúvel UVB
		Avobenzona	Químico lipossolúvel UVA
		Dióxido de titânio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
		Etilhexil triazona	Químico lipossolúvel UVB
		Ácido tereftalideno dicânfora sulfônico	Químico hidrossolúvel UVA
		Hidróxido de alumínio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
Protetor D	Formulação gel-creme de FPS 30 rotulado	Etilhexil metoxicinamato	Químico lipossolúvel UVB
		Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	Químico lipossolúvel UVA/UVB
		Metileno bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol	Químico hidrossolúvel UVA/UVB (também reflete o UV)
		Dióxido de titânio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
		Óxido de alumínio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
Protetor E	Formulação gel-creme de FPS 50 rotulado	Homosalato	Químico lipossolúvel UVB
		Salicilato de 2-etilhexila	Químico lipossolúvel UVB
		Etilhexil triazona	Químico lipossolúvel UVB
		Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina	Químico lipossolúvel UVA/UVB
		Drometrizol trisiloxano	Químico lipossolúvel UVA/UVB
		Avobenzona	Químico lipossolúvel UVA
		Octocrileno	Químico lipossolúvel UVB
		Hidróxido de alumínio	Físico lipossolúvel UVA/UVB
		Ácido tereftalideno dicamfor sulfônico	Químico hidrossolúvel UVA
		Dióxido de titânio	Físico lipossolúvel UVA/UVB

Fonte: Dados obtidos a partir do rótulo das formulações dos protetores solares utilizados para os ensaios de determinação de FPS.

2.1. Determinação de FPS por métodos de espectrofotometria de absorvância

Para a análise do FPS *in vitro* por método espectrofotométrico foi utilizada para os cálculos e determinação do FPS a metodologia de MANSUR (1986), que está descrita no artigo “Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria”. Para executar o preparo das amostras e realização dos testes, foram utilizados como base dois artigos que descrevem metodologias diferentes para solubilizar as amostras de protetor solar para a efetuação dos testes e dos cálculos do FPS pelo método Mansur. Essas metodologias utilizadas foram segundo Ribeiro (2004) (método de solubilidade I para determinação de FPS) e segundo Dutra (2004) (método de solubilidade II para determinação de FPS). A utilização de duas metodologias diferentes de preparo da amostra para realização dos testes de Mansur e a modificação de aspectos delas foram feitas visando uma melhor solubilização da amostra e uma obtenção de resultados de FPS mais próximos aos rotulados. As leituras das amostras foram feitas no espectrofotômetro UV/VIS Evolution 60S da Thermo scientific com emprego de lâmpada de xênon, utilizando cubeta de quartzo, sendo medidas as absorvâncias nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de leitura de 5 em 5 nm.

2.1.1. Método de solubilidade I para a determinação de FPS

Utilizando essa metodologia, pesou-se 500 mg da amostra de protetor solar em um béquer de 100 mL e colocou-se 30 mL de etanol. Mexeu-se então a mistura com um bastão de vidro, e em seguida promoveu-se agitação mecânica com agitador magnético por 10 minutos, a fim de que o processo auxiliasse na solubilização da amostra. Após esse procedimento, a preparação foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL, sendo feita uma transferência quantitativa, e então foi completado o volume com o etanol. Agitou-se ligeiramente a mistura e transferiu-se uma alíquota de 1 mL dessa para um balão de 25 mL.

Completou-se então o volume com etanol e agitou-se a preparação ligeiramente para distribuição da alíquota no solvente. Após essas diluições, a concentração final da amostra foi de 0,2 mg de protetor por mL de solvente, concentração exigida para a realização da leitura para determinação do FPS, segundo a metodologia utilizada. Por fim, foi realizada a leitura em triplicata da amostra, em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo. Foi medida a absorbância nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de leitura de 5 em 5 nm. O branco utilizado no teste foi feito com o etanol (RIBEIRO, 2004).

2.1.2. Método de solubilidade II para a determinação de FPS

Pesou-se 1 g do protetor solar em um béquer de 250 mL, colocou-se aproximadamente 95 mL do álcool (etanol ou isopropanol, ambos foram testados), misturou-se com um bastão de vidro, seguido de agitação mecânica com agitador magnético por 10 minutos, a fim de que o processo auxiliasse na solubilização da amostra. Posteriormente, levou-se o béquer ao ultrassonicador por 10 minutos para uma melhor solubilização, sendo realizada leve agitação manual concomitantemente. Após esse procedimento, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o álcool (DUTRA, 2004).

Depois dessa etapa foram feitos dois procedimentos diferentes para comparar os resultados, a fim de verificar se haveria discrepância entre eles e se algum deles daria um resultado maior de FPS. Em um teste foi realizada a filtração dessa mistura utilizando algodão, rejeitando-se os 10 mL iniciais; e em outro ensaio não foi realizada a filtração prévia. Em seguida, após os procedimentos e posterior agitação para que a preparação toda tivesse a mesma concentração do analito, utilizou-se uma alíquota de 5 mL dessa, transferiu-se para um balão de 50 mL e o volume foi completado com o mesmo álcool que estava sendo utilizado. Por fim, tomou-se uma alíquota de 5 mL da última diluição e transferiu para balão

volumétrico de 25 mL, sendo completado o volume com o álcool. Após essas diluições, a concentração final da amostra foi de 0,2 mg de protetor por mL de solvente, concentração exigida para a realização da leitura para determinação do FPS (DUTRA, 2004).

Terminadas todas as etapas, obteve-se uma solução, de aspecto mais transparente. Foi realizada a leitura em triplicata da amostra, no espectrofotômetro, executando-se breve agitação da amostra antes da colocação dela na cubeta. Foi medida a absorbância nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de leitura de 5 em 5 nm. O branco utilizado no teste foi feito com o mesmo solvente utilizado, sendo então o álcool usado nas diluições das amostras (DUTRA, 2004).

A fim de ilustrar melhor todas as etapas realizadas nos testes utilizando o método de solubilidade II, foi elaborado um esquema (**Figura 1**).

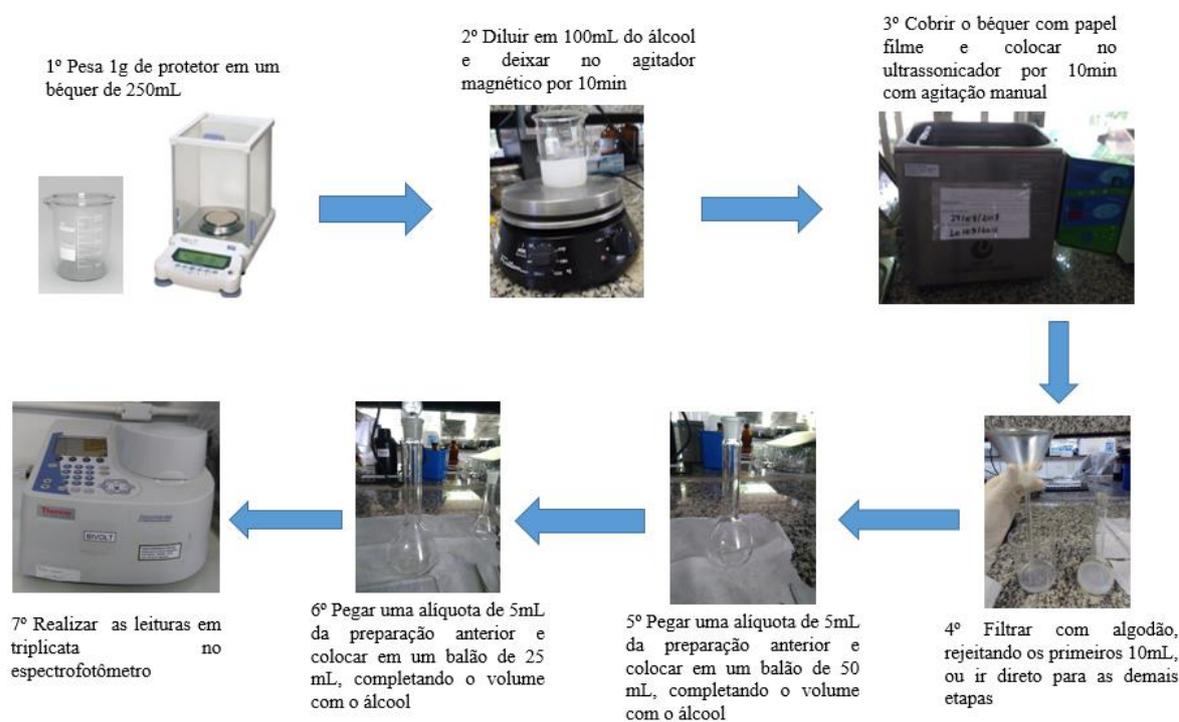


Figura 1: Esquema ilustrativo do método de solubilidade II

2.1.3. Cálculos do FPS baseados em Mansur

Finalizada as leituras em ambos os métodos, foram feitos os cálculos de FPS de acordo com Mansur (1986), **Equação 1**:

Equação 1

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

Sendo:

FC = Fator de correção, que é 10 (baseado na medida do padrão creme 8% de homosalato, cujo FPS é 4).

EE = Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ .

$I(\lambda)$ = Intensidade da luz solar no comprimento de onda λ .

$Abs(\lambda)$ = Leitura espectrofotométrica da absorbância da solução preparada no comprimento de onda λ .

O fator de correção é um valor fixo já estabelecido. Esse valor foi o ajuste necessário na equação para que o resultado do cálculo do FPS do padrão creme de homosalato 8% fosse 4, que é o valor conhecido do composto.

A multiplicação do efeito eritematogênico (EE) pela intensidade solar é um valor padrão para cada comprimento de onda e está na **Tabela 2** (MANSUR, 1986).

Tabela 2: Relação entre os comprimentos de onda e a multiplicação do efeito eritematogênico pela intensidade solar

Comprimento de onda (nm)	EE x I (normalizado) (Valores relativos)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
TOTAL	1

EE: Efeito eritematogênico obtido com radiação monocromática no comprimento de onda (λ) - I: intensidade solar no comprimento de onda (λ). Fonte: MANSUR, 1986a.

2.1.4. Teste com o padrão

O homosalato é um filtro solar orgânico determinado pela FDA como padrão a ser utilizado para validação de testes *in vitro*. Segundo a agência norte-americana, uma formulação-base creme contendo 8% de homosalato deve ter um FPS de $4,47 \pm 1,279$. Para o teste ser considerado válido, o valor do FPS tem que estar dentro do desvio padrão e o intervalo de confiança de 95% tem que conter o valor 4 (*FOOD AND DRUG ADMINISTRATION*, 2018).

Para obtenção do FPS com o padrão homosalato, primeiramente preparou-se a formulação-base (gel-creme) baseando-se na descrita por Rasche (2014), com modificações. Os componentes utilizados para fazer 100g da formulação, bem como suas proporções estão na **Tabela 3**.

Tabela 3: Componentes da formulação-base para o gel-creme 8% de homosalato

Componentes	Proporção na formulação (%)
Natrosol	5%
EDTA	0,1%
Propilenoglicol	1%
Metilparabeno	0,2%
Álcool cetosteárfílico etoxilado	1%
Álcool cetosteárfílico	2%
Ciclometicone DC 245	2%
Silicone 9040	1%
Tampão Mcilvaine (pH 6,5 a 5,5)	87,7%

Após 24 horas do preparo da formulação, incorporou-se o homosalato na concentração de 8% e procedeu-se o teste. Levando em consideração que o homosalato é líquido à temperatura ambiente, empregou-se a densidade (1,05 g/mL) para descobrir o volume a ser colocado. Encontrou-se que a alíquota a ser incorporada à formulação seria de 76 µL/g.

Procedeu-se o teste de FPS seguindo o mesmo método utilizado para os demais protetores solares com o método de solubilidade II, sem filtração e com o uso do isopropanol como solvente. A concentração final do padrão na última diluição (de leitura) foi 0,016 mg/mL, que é a descrita pela FDA (2018).

Como o FPS resultante foi abaixo do preconizado pela agência norte-americana, procedeu-se também a determinação do FPS do homosalato não veiculado em base, utilizando o método de solubilidade II, empregando o DMSO (dimetilsulfóxido) como

solvente, que havia sido utilizado por Jerspersen (1989) em formulações contendo homosalato como filtro solar.

2.2. Determinação de FPS por método de espectrometria de reflectância

Para a determinação do FPS pelo método de espectrometria de reflectância foi utilizada a metodologia COLIPA (2011) tanto para o preparo da amostra quanto para a realização dos cálculos. O equipamento utilizado para a realização das leituras da transmitância das amostras foi o espectrofotômetro Lambda 750/NiR com esfera integrada (spectralom), com determinação na faixa de 290 a 400 nm de 1 em 1 nm. A passagem de banda foi configurada para 2 nm e o tempo de integração foi ajustado para 2 segundos.

2.2.1. Metodologia COLIPA

A metodologia do COLIPA *in vitro* para a determinação do FPS de protetores solares foi criada por essa associação e está descrita no guia “*In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products*” (COLIPA, 2011).

Essa metodologia avalia o FPS utilizando a espectrometria de reflectância com esfera integrada, utilizando uma placa de PMMA (*Poly(methylmethacrylate)*-Polimetilmetacrilato) contendo o produto aplicado na forma de filme.

Foram utilizadas três placas de PMMA nos experimentos, medindo 5x5 cm cada uma. Primeiramente, as placas foram limpas com álcool para garantir que nenhuma sujeira alterasse as leituras. Depois, com o auxílio de uma caneta permanente, foram feitas margens de 1 cm nas placas para demarcar a área de leitura em concordância com o espaço disponível para a colocação da amostra no equipamento. Além disso, as placas foram enumeradas como 1, 2 e 3 para correta identificação. Após isso, foram feitas as leituras apenas dessas placas,

sem amostra, sendo utilizadas como branco. Mediu-se as placas em 4 pontos diferentes, girando a placa 3 vezes em sentido horário, para garantir que fosse aferida uma área de pelo menos 2 cm² (COLIPA,2011).

Em seguida, foram preparadas as amostras (três de cada protetor, já que os testes foram realizados em triplicata), aplicando cada amostra de protetor solar em uma placa de PMMA, sendo utilizado o peso como medida de quantidade, colocando-se uma média de 1,3 mg/cm². Como a placa tem 5x5 cm, pesou-se 6,5 mg de protetor em cada placa, colocando frações do protetor espalhadas por toda a placa (COLIPA,2011). Essa etapa de pesagem foi realizada no LTMAC (Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, alimentos e Cosméticos), utilizando a balança analítica semi micro, modelo AUW 220D.

Imediatamente após a aplicação e o processo de conferência de peso, empregando movimentos leves e utilizando a ponta do dedo com luva “pré-saturada” com o produto, espalhou-se o filtro solar sobre toda a superfície. Esse espalhamento foi feito em duas fases, como manda a metodologia. Na primeira fase distribuiu-se o produto em toda a área com a ponta do dedo, sendo feita o mais rápido possível (menos de 30 segundos) sem aplicação de nenhuma pressão. Depois, esfregou-se durante 20 a 30 segundos, aplicando uma pressão (COLIPA, 2011).

Deixou-se então a placa com a amostra no escuro à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) por 15 minutos para que fosse formada uma película estável de produto. Após esse tempo, tirou-se a amostra do escuro e o protetor solar foi removido das margens que haviam sido previamente marcadas nas placas (**Figura 2A**). Após essa rápida remoção, a placa com a amostra foi colocada no equipamento para a realização das leituras (**Figura 2B**). As placas foram medidas em 4 pontos diferentes, girando a placa 3 vezes em sentido horário, para garantir que fosse aferida uma área de pelo menos 2 cm². O mesmo procedimento foi

realizado com as demais placas. Os dados foram tabelados e tratados no Excel. Os cálculos foram feitos utilizando a **Equação 2** (COLIPA, 2011).

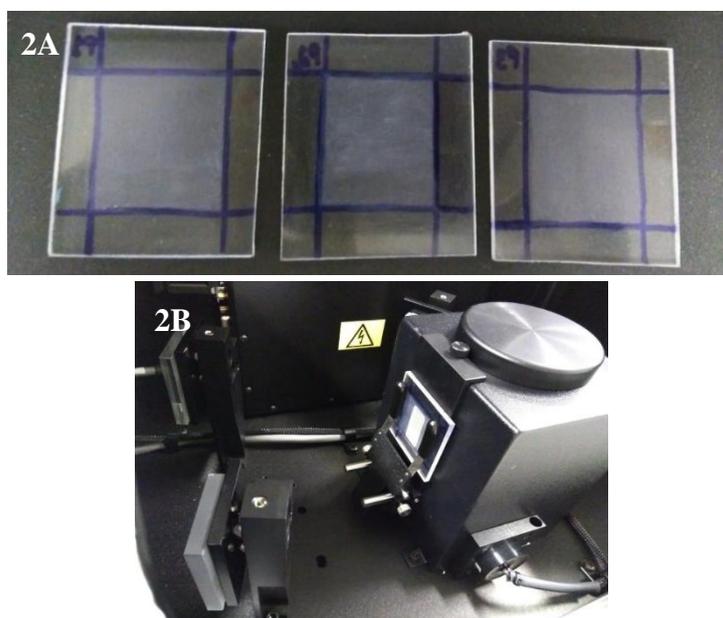


Figura 2: Imagens exemplo do teste COLIPA. (A) Placas com amostra de protetor solar delimitada na área de leitura, com protetor solar removido das margens. (B) Placa inserida dentro do espectrofotômetro no local de leitura da amostra.

Equação 2

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

Sendo:

$E(\lambda)$ = Espectro de ação do eritema (anexo 1); $I(\lambda)$ = Irradiância da fonte UV (anexo 1).

$A_0(\lambda)$ = Medidas de absorvância monocromática por placa de produto em teste antes da exposição ao UV.

$d\lambda$ = Intervalo de comprimento de onda (1nm).

*A equação foi retirada do guia COLIPA (2011). Os valores de $E(\lambda)$ e $I(\lambda)$ já são padronizados e estão descritos no guia.

2.3. Comparação das metodologias de determinação de FPS por absorbância e por reflectância

A comparação entre as duas metodologias (MANSUR, 1986 e COLIPA, 2011) foi realizada analisando os resultados finais (médias \pm desvio padrão) de FPS das amostras de cada protetor solar. Foi observada qual metodologia obteve resultados mais próximos aos valores rotulados dos respectivos protetores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação de FPS por métodos de espectrofotometria de absorvância

No ensaio com padrão de homosalato a 8%, empregando o método de solubilidade II com o isopropanol sem filtração, resultou em um FPS, calculado pela equação de Mansur, de aproximadamente 0,7; sendo esse um valor inferior ao de FPS preconizado, que é 4. Porém, foi observado que a formulação não havia sido solubilizada, houve a formação de um filme resistente de textura parecida com plástico. Concluiu-se a partir disso que poderia ter ocorrido incompatibilidade dos componentes da formulação com o solvente.

No ensaio com o padrão homosalato não veiculado, o FPS resultante da leitura foi 0,82. Esse resultado encontrado, quase igual ao que se obteve com o isopropanol, invalidou o teste de acordo com o que determina o FDA (2018).

Esse FPS baixo pode ser devido a não utilização de uma formulação creme ideal como é preconizada, e sim do padrão puro ou gel-creme. Além disso, o homosalato foi incorporado à formulação do gel-creme após esta estar finalizada, ao invés de ser incorporado na fase oleosa, que era o ideal. Isso ocorreu devido ao fato de que não havia quantidade suficiente de padrão de modo que ele ficasse na concentração de 8% na formulação de 100 g. Como não havia tempo hábil para adquirir novo padrão e adequar a quantidade de formulação a ser preparada para a quantidade de padrão que poderia ser utilizada não foi possível, devido a impossibilidade de fazer uma formulação com quantidades consideravelmente pequenas, resolveu-se incorporar somente no final. Isso pode ter gerado então a não incorporação total no gel-creme e, por conseguinte, a incompatibilidade com o solvente.

Os resultados de FPS das formulações comerciais obtidos utilizando a metodologia de Mansur (1986) também não foram satisfatórios, visto que os FPS calculados ficaram

consideravelmente abaixo dos rotulados. Os primeiros testes com as formulações foram feitos tendo como base os procedimentos de preparo da amostra adotados por Ribeiro (2004) e em testes posteriores preparou-se as amostras tendo como base os procedimentos descritos por Dutra et al (2004), como relatado na metodologia. Além disso, testou-se também o FPS modificando ligeiramente a metodologia usada.

A troca de metodologia de preparo da amostra com o intuito de obter uma melhor solubilização e, conseqüentemente, um FPS encontrado mais coerente com o rotulado, não influenciou tanto no resultado desse fator, já que não houve melhoras significativas no seu valor com a mudança de procedimentos, como é visto nas tabelas que se seguem nos próximos subitens referentes à determinação de FPS.

3.1.1. Método de solubilidade I para a determinação de FPS

O único procedimento que foi acrescentado no preparo da amostra, que não consta na referência original, foi a agitação da mistura com o auxílio de agitador magnético a fim de obter uma maior solubilização do protetor no etanol, já que foi observada a formação de partículas no fundo do béquer.

Os resultados do FPS calculado das amostras lidas em triplicata estão contidos na **Tabela 4**. Os cálculos foram feitos com a utilização da **Equação 1**, substituindo pelos valores padronizados (**Tabela 2**) a multiplicação do efeito eritematogênico pela intensidade solar em cada comprimento de onda.

Tabela 4: Avaliação do FPS com modificações segundo método de solubilidade I

	Protetor A	Protetor B	Protetor D
FPS rotulado	30	30	30

FPS experimental (média ± desvio padrão)	4,54 ± 0,06	6,31 ± 0,03	6,32 ± 0,05
---	--------------------	--------------------	--------------------

Os resultados de FPS (Fator de Proteção Solar) são de testes realizados em triplicata.

Como abordado na metodologia, estava descrito nos respectivos rótulos dos protetores solares A, B e D que eles possuíam FPS 30. Porém, como observado na **Tabela 4**, os valores encontrados nos testes foram consideravelmente mais baixos do que os rotulados. O protetor solar A, cuja formulação é creme, apresentou FPS 4,54, sendo mais de seis vezes menor que o rotulado. O protetor solar B, cuja formulação também é creme, apresentou FPS 6,31, sendo quase 5 vezes menor que o rotulado. Já o protetor solar D, cuja formulação é gel-creme, teve como resultado um FPS 6,32, bem próximo ao encontrado para o protetor B.

Levando em consideração os baixos FPS encontrados, inferiu-se que esse resultado se devia ao fato de que as amostras não haviam solubilizado completamente, já que foram observadas partículas no fundo do béquer após os processos de mistura. Essa hipótese é ratificada por Pinho e colaboradores, pois o FPS encontrado depende da solubilidade do filtro solar no solvente. No mesmo artigo, é explicado que a solução com a amostra tem que estar com o pH entre 7,2 e 7,5 para que o filtro solar hidrossolúvel tenha seu FPS total, visto quando estão na forma ácida esses filtros são insolúveis e perdem sua capacidade de refletir ou absorver radiação UV (PINHO et al., 2014).

Os autores desse artigo realizaram testes segundo Mansur, seguindo também a metodologia de Ribeiro (método de solubilidade I). Os ensaios foram feitos com 5 formulações de protetores solares em gel e eles obtiveram resultados de FPS também muito abaixo dos rotulados. Para eles, a diferença entre o FPS experimental e o FPS rotulado pode ter se dado devido ao pH das amostras, que dificultou a solubilização dos filtros solares; ou devido às interações que possam ter ocorrido entre os excipientes das formulações e os filtros

solares, favorecendo a degradação desses últimos (PINHO et al., 2014). Porém, a hipótese de que as soluções estudadas poderiam estar com um pH fora da faixa em que os protetores são solúveis foi ligeiramente descartada, pois foi medido o pH de uma das soluções em que foram observadas partículas e o pH se encontrava dentro do ideal (7,4) (protetor E). Não foi possível medir o pH das demais soluções, pois quando essa hipótese foi levantada, os testes com os demais protetores solares já haviam sido feitos. Além disso, mesmo se o pH das soluções estivesse fora da faixa ideal, isso não seria suficiente para afirmar que a diferença entre os resultados dos testes e os FPS rotulados seria devido a esse fato, visto que há poucos filtros hidrossolúveis nas formulações, como foi mostrado na **Tabela 1**.

Observou-se então que as amostras testadas não haviam sido totalmente solubilizadas, possivelmente por conta do solvente utilizado, que poderia não ter tanta afinidade com os componentes da formulação. Optou-se então por testar uma outra metodologia a fim de conseguir solubilizar melhor a amostra.

3.1.2. Método de solubilidade II para a determinação de FPS

Com o intuito de solubilizar melhor os protetores solares no solvente a fim de obter um FPS mais próximo do rotulado, foi testado esse método, porém com algumas alterações para aumentar a solubilidade do protetor no álcool.

Uma das alterações realizadas foi a implantação da etapa de agitação da mistura em agitador magnético antes da colocação no ultrassonicador, pois quando ela era colocada direto no aparelho, foi observada a presença de partículas grandes da amostra que não haviam sido dissolvidas (**Figura 3A**).

Com a realização da agitação magnética por 10 minutos, essas partículas grandes foram desfeitas e restaram apenas pequenas partículas no fundo da preparação (**Figura 3B**).

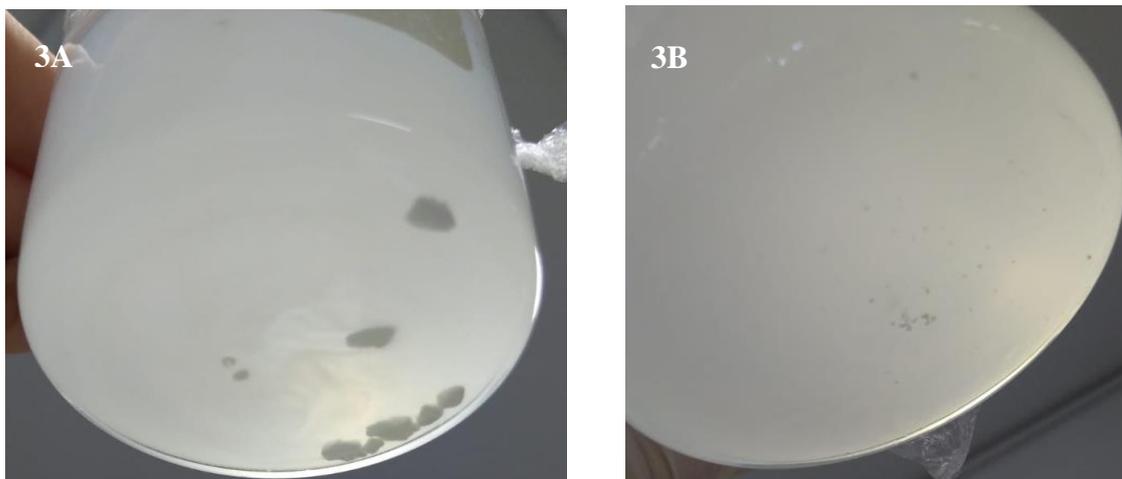


Figura 2: Aparência do protetor solar B obtido utilizando o solvente etanol. As figuras são do teste com o protetor solar B feito com filtração utilizando o solvente etanol. (A) Presença de partículas grandes no fundo do béquer quando feito o teste sem a realização do processo de agitação magnética. (B) Redução no tamanho e número de partículas no fundo do béquer quando acrescentada a etapa de agitação magnética na metodologia.

Outra alteração feita no método foi que ao invés de deixar no ultrassonicador por 5 minutos, como descrito nessa metodologia, deixou-se por 10 min com agitação manual concomitante para auxiliar na solubilização. Isso foi feito porque foi observado que com 5 minutos, ainda havia a formação de partículas no fundo, o que era diminuída consideravelmente com um acréscimo de 5 minutos no equipamento.

Também testou-se mudando o álcool (etanol e isopropanol) a fim de testar se com outro solvente haveria uma melhor solubilização do filtro solar e a manutenção da sua atividade.

Além disso, testou-se a metodologia com filtração e sem filtração, pois acreditava-se que a filtração implantada por Dutra et al. (2004), influenciara nos valores de absorvância que se mostraram reduzidos pela possibilidade de retenção dos filtros solares no algodão.

Todas as alterações foram feitas utilizando uma única formulação, o protetor B, a fim de que pudessem ser comparados os resultados tanto de solubilidade quanto de FPS. Assim, a partir de uma análise dos dados foi possível escolher a melhor maneira de realizar os testes

com as demais formulações. Os resultados dos ensaios, bem como a descrição das alterações que foram feitas estão presentes na **Tabela 5**.

Tabela 5: Avaliação do FPS do protetor solar B seguindo o método de solubilidade II com modificações (método de Mansur, 1986)

FPS (média ± desvio padrão)	SOLVENTE USADO	MODIFICAÇÃO	
		Com filtração	Sem filtração
	Etanol	6,46 ± 0,1612	6,34 ± 0,1587
	Isopropanol	6,55 ± 0,0512	6,99 ± 0,0549

Os resultados representam os testes feitos em triplicata. FPS: fator de proteção solar.

Após análise dos dados, foi possível observar que foram obtidos resultados próximos comparando ambos os métodos de solubilidade e os solventes utilizados, não sendo vista diferença significativa. Porém, foram obtidos valores de FPS ligeiramente maiores, apesar de pouca significância, com a realização do método de solubilidade II, utilizando isopropanol como solvente ao invés do etanol e ainda sem a realização de filtração. Isso ocorreu porque o isopropanol (C₃H₈O), por possuir mais carbono em sua composição, é menos polar do que o etanol (C₂H₆O). Assim, pode ter solubilizado mais os filtros lipossolúveis das formulações, que estão presentes na maioria delas. Porém, como essa diferença de polaridade não é tão expressiva, não impactou tanto no FPS, causando um aumento mínimo nos resultados.

Sabendo disso, foram testados então mais 3 protetores solares com o uso do isopropanol como solvente e sem filtração (**Tabela 6**)

O protetor solar A não foi utilizado nesses testes porque não havia quantidade suficiente para ser testada.

Tabela 6: Avaliação do FPS dos protetores solares seguindo o método de solubilidade II e utilizando isopropanol, sem filtração (método de Mansur, 1986).

Protetores solares	FPS rotulado	FPS (média ± desvio padrão)	Porcentagem das médias em relação ao FPS rotulado
Protetor B	30	6,99 ± 0,05	23%
Protetor C	30	6,67 ± 0,04	22%
Protetor D	30	6,90 ± 0,10	23%
Protetor E	50	11,54 ± 0,66	23%

Realizado em triplicata. FPS: Fator de Proteção Solar

Os valores encontrados nos testes foram consideravelmente mais baixos do que os rotulados. O protetor B (creme) obteve no teste um FPS 7, mais de 4 vezes menor do que o que constava no rótulo. O protetor C (loção) apresentou um FPS 6,67, sendo 4,5 vezes menor que o rotulado. O protetor D (gel-creme), cujo FPS experimental deu 6,90, teve um resultado também mais de 4 vezes mais baixo do que o dito na embalagem. Já o protetor E (gel-creme) apresentou um FPS de 11,54, o mais alto de todos, porém também possuía um FPS rotulado mais alto (50), sendo assim, o experimental foi 4,3 vezes mais baixo do que o descrito na embalagem.

Apesar de terem sido observados aumentos nos resultados do FPS após a realização dessas pequenas modificações, esses não foram considerados significativos, visto que se o FPS é dado em números inteiros, o aumento máximo obtido foi de 6 para 7. Portanto, apesar de algumas diluições quase não ter ou de não ter sido observada a formação de grânulos no fundo do béquer que não foram solubilizados, não houve ganhos significativos no FPS.

Nos experimentos com isopropanol sem filtração, algumas misturas se mostraram visualmente mais solubilizadas do que outras, visto que em algumas, mesmo com a implementação de fatores que proporcionassem um aumento na solubilidade, foi observada a presença de mais partículas que não se dissolveram no fundo do béquer. Isso é observado na **Figura 4**.

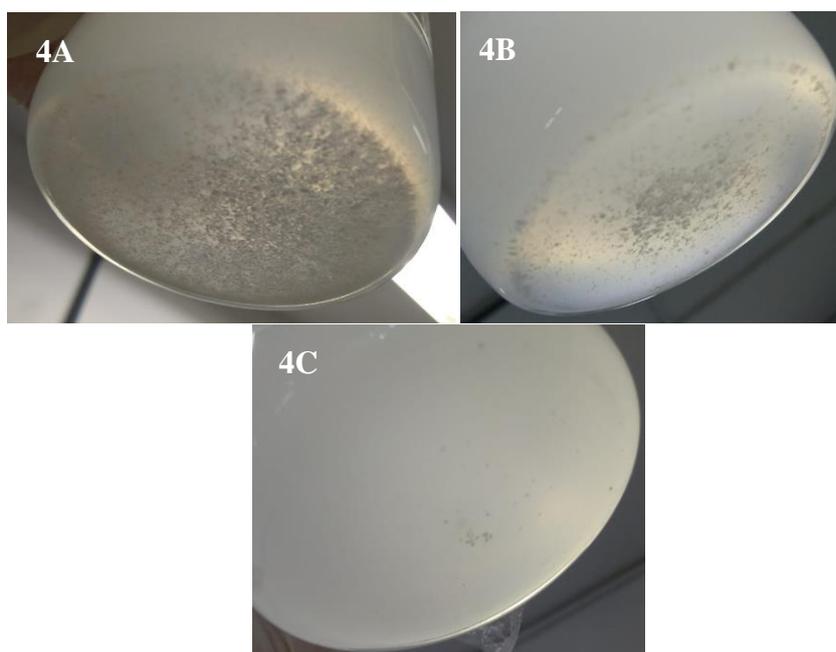


Figura 3: Diferença na presença de partículas de fundo e turbidez nas diluições de protetores solares. (A) Protetor C com isopropanol. (B) Protetor B com isopropanol. (C) Protetor B com etanol.

A **Figura 5** é um exemplo da aparência das diluições feitas com o método de solubilidade II, sendo a última o balão de 25 mL, do qual retirou-se as amostras para a realização das leituras.

Na **Figura 5** é possível observar que a diluição 1, a que está no béquer, apresenta turbidez e opacidade significativas. As demais diluições também apresentam em menor grau essas propriedades. Segundo Pinho (2014), a presença de turbidez denota que a amostra não foi completamente solubilizada no meio, e portanto, o filtro solar, que se encontra disperso,

não apresenta sua eficácia total (PINHO et al., 2014). A **Figura 4** também evidencia a turbidez das diluições dos diferentes protetores solares e prova que as que tiveram menos partículas no fundo não necessariamente se encontravam mais solubilizadas, pois apresentavam também maior turbidez.

Para tentar uma maior solubilização da amostra e o preparo de uma solução homogênea, em ensaios futuros poderia ser testada uma mistura de dois álcoois, um mais polar como o metanol e outro mais apolar como o isopropanol para que houvesse maior afinidade com os componentes da formulação e tanto os filtros hidrossolúveis, quanto os lipossolúveis pudessem ser solubilizados. Como há uma presença maior de filtros lipossolúveis nas formulações, o volume colocado de solvente com caráter mais apolar seria maior do que o de caráter mais polar.



Figura 4: Exemplo da aparência das diluições feitas utilizando como base o método de solubilidade II. Diluições do protetor solar B com isopropanol sem filtração

Os FPS das formulações analisadas também podem ter dado consideravelmente abaixo do rotulado porque todos os protetores testados possuíam dióxido de titânio, dentre outros filtros físicos, em sua composição, em maior ou menor quantidade. Formulações que possuem filtro físico, como talco, dióxido de titânio e óxido de zinco, como relatado por

Sayre e colaboradores (1978), não devem ser testadas por esse método em que é necessário fazer uma diluição da amostra, visto que esses filtros são insolúveis nos solventes utilizados para as análises. Sendo assim, esses métodos não retratam a fotoproteção dada por esses filtros (SAYRE, 1978). Portanto, o FPS retratado nos testes é apenas uma parcela do FPS da formulação.

Além disso, como os cálculos dos testes segundo Mansur são realizados a partir do resultado da absorbância das amostras, a proteção conferida pelos filtros físicos que tem a capacidade de refletir a radiação UV, não é considerada.

Sendo assim, essa metodologia não é tão adequada para medir o FPS dos protetores solares disponíveis no mercado atual, já que as formulações fotoprotetoras vendidas atualmente são em sua maioria compostas por uma mistura de filtros físicos e químicos. O teste *in vitro* mais indicado para esse tipo de protetor, como Sayre (1978) coloca, é um que mede tanto a absorção quanto a transmissão de radiação pelo protetor, abrangendo ambos os filtros. O método que utiliza esse princípio é o de *COLIPA*, reconhecido pelo FDA.

Outra questão a ser discutida é o fato de que os resultados de FPS dos testes com a metodologia de Mansur (1986) deram cerca de 23% do valor de FPS rotulado, e o teste com o padrão de homosalato deu cerca de 20% do preconizado pelo FDA. Esse fato levantou algumas questões: se isso não teria ocorrido devido a um erro de análise ou a um ajuste no equipamento que precisava ser feito, e se poderia ser corrigido com a alteração do fator de correção. Na literatura não foi encontrado nada a respeito de uma possibilidade de ajuste nesse valor, porém essa semelhança pode indicar que se houvesse uma mudança no fator de correção da equação a partir do valor obtido com a realização do teste com o padrão, os valores de FPS seriam bem próximos ao rotulado.

3.2. Determinação de FPS por método de espectrofotometria de reflectância

Foram feitos os testes com três das cinco formulações utilizadas nos testes da metodologia de Mansur. Os testes que foram feitos utilizando a metodologia COLIPA (2011) seguiram os procedimentos conforme descrito no guia “*In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products*”, sem nenhuma alteração.

Após todas as leituras, os dados foram plotados em planilhas do excel e foram feitos os cálculos utilizando a **Equação 2**, que é a preconizada pelo guia da COLIPA (**Tabela 7**).

Aplicou-se os dados das leituras na **Equação 2** (sugerida pelo guia da COLIPA). Para que fosse colocada a transmitância correta apenas do protetor solar, fez-se uma regra de três relacionando a transmitância do branco com a da placa com protetor, considerando a transmitância da placa sem protetor como 100%. Analisando a **Tabela 7**, é possível visualizar que se alcançou dois resultados ainda abaixo do rotulado e um acima do rotulado. Apesar de duas das médias de FPS terem sido mais que o dobro e quase o triplo das obtidas com o método Mansur (protetores B e E respectivamente), os resultados continuaram abaixo do que constava na embalagem. O protetor B teve um FPS experimental de aproximadamente 15, metade do valor rotulado, que era 30. A formulação E apresentou um FPS analisado de 31,79, quase um terço a menos do que o valor rotulado, que era 50. Já o protetor C, o único que apresentou um FPS maior do que o rotulado, obteve um FPS experimental de aproximadamente 39,64, cerca de 30% a mais do que constava na embalagem.

Tabela 7: Avaliação do FPS pelo método COLIPA (2011)

Protetores solares	FPS rotulado	FPS (Média ± Desvio padrão)
Protetor B	30	14,917 ± 2,55
Protetor C	30	39,6375 ± 9,54
Protetor E	50	31,795 ± 6,00

Resultados em triplicata. FPS: Fator de Proteção Solar

Para todos os protetores solares houve grande variabilidade das medidas de FPS. As diferenças entre as medidas de FPS das placas podem se dever ao fato de que o teste *COLIPA*, com a intenção de simular o espalhamento do protetor na pele, depende do condutor do teste. Ao aplicar as pequenas gotas de protetor solar espalhadas em toda a placa, não há garantia de que as gotas vão estar no mesmo lugar e terão a mesma massa em todas as placas, portanto, mesmo que isso seja evitado, um lugar pode ter maior quantidade de protetor do que outro. A pesagem da quantidade de protetor na placa também é vista como ponto crítico na execução do teste, pois é uma quantidade muito pequena e deve ser precisamente pesada para que seja formado um filme fino da formulação.

Além disso, como o espalhamento também é feito pelo manipulador, está sujeito a erros, pode haver uma distribuição maior ou menor. Foi observado durante os testes que fatores como a marca da luva utilizada facilitavam ou dificultavam a execução do espalhamento do protetor solar na placa, por causa do atrito que causavam. Além disso, uns protetores solares tinham uma secagem mais rápida do que outros, permitindo um melhor ou pior espalhamento. O protetor em creme (B), por exemplo, seca rapidamente, portanto o espalhamento deveria ser o mais rápido possível para que ele fosse bem distribuído na placa antes da secagem e formação do filme. Isso porque depois do filme ser formado, a passagem

do dedo nele retira parte do protetor da placa. O protetor loção (C), como é mais líquido, demora mais tempo para formar o filme, assim obteve-se um melhor resultado de espalhamento. Isso pode ter influenciado nos resultados, sendo a uniformidade de distribuição da formulação fator essencial para a obtenção de um resultado mais próximo do esperado.

O baixo valor de FPS pode estar relacionado ao fato de uma possível degradação do filtro solar na embalagem ao longo do tempo em que o protetor solar estava aberto, ou realmente a formulação estava com menor quantidade de ingrediente ativo do que deveria. Isso já aconteceu outras vezes com formulações vendidas no Brasil testadas pela PROTESTE (Associação Brasileira de Defesa do Consumidor) (PROTESTE, 2018).

Além disso, a diferença entre o FPS experimental e o rotulado pode ser explicada pela escolha das formulações, já que foram testadas apenas formulações com fator de proteção elevado (30). Segundo Mansur, a correlação entre o FPS *in vivo* e *in vitro* é menor em filtros solares com fatores de proteção mais altos, visto que a determinação deles em humanos está mais propensa a uma margem de erro maior (MANSUR et al., 1986b). Isso acontece porque os testes feitos *in vivo* consideram a interação da pele humana com o protetor solar, que é diferente para cada tipo de pele, diferentemente do teste *in vitro*, que não reproduz completamente as circunstâncias de uso dos protetores (DAHER, 2014 apud NEVES, 2008; MILESI, 2002).

Outro ponto a ser destacado é a necessidade de avaliar uma formulação padrão para garantir a viabilidade do ensaio.

3.3. Comparação das metodologias de determinação de FPS por absorvância e por reflectância

A **Figura 7** compara as médias dos resultados da determinação de FPS pelas metodologias de absorvância e reflectância para que a diferença entre ambos seja melhor visualizada. Além disso, compara ambos com o valor de FPS rotulado.

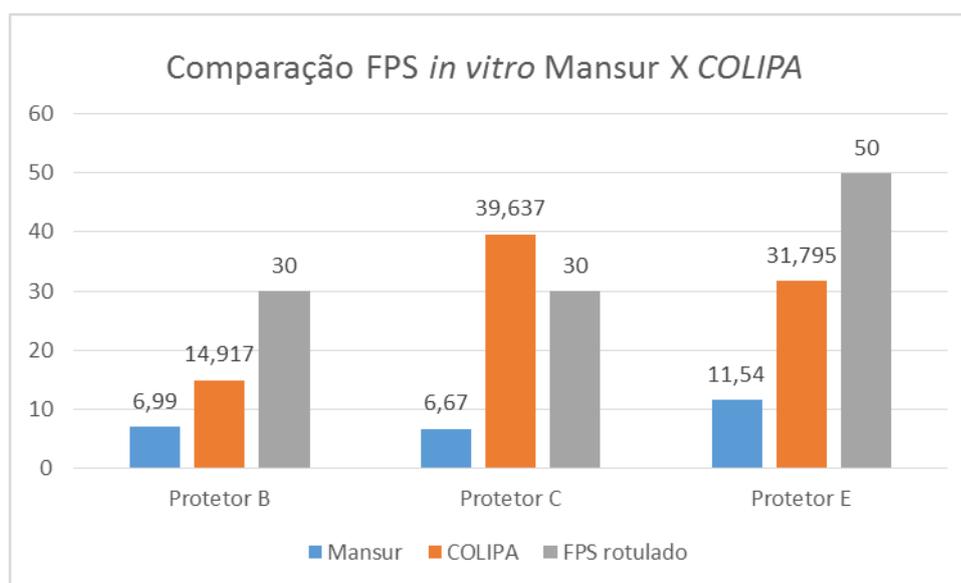


Figura 5: Comparação das metodologias de Mansur e COLIPA

No Gráfico 1 é possível visualizar a grande diferença de resultado entre as metodologias utilizadas, sendo os resultados de FPS dados pelo método *COLIPA* o dobro, o triplo, ou até seis vezes o valor do FPS dado pela metodologia Mansur.

Os valores mais altos de FPS utilizando a metodologia de *COLIPA* em comparação com a de Mansur podem ter sido obtidos porque nesse experimento foram feitas as leituras da transmitância das amostras e, portanto, obteve-se o quanto de radiação passou através do protetor solar. Assim, foi calculado o que realmente não passou pela placa com o protetor. Ou seja, foi possível medir a atividade tanto dos filtros que absorvem, quanto os que refletem e dispersam a radiação solar.

Além disso, a medida do FPS pelo teste *COLIPA* não depende da solubilização do protetor em nenhum solvente, dessa forma, protetores com filtros físicos que não são solúveis nos solventes utilizados nos testes de Mansur poderiam ser medidos também (SAYRE, 1978).

4. CONCLUSÕES

Apesar da metodologia de Mansur ser bem mais simples, rápida e de menor custo, além de ser menos dependente do executor do teste, há algumas dificuldades em realizá-la, como o obstáculo da solubilização da amostra. Aliado a isso, há o fato de que esse tipo de experimento com solução não deve ser usado para avaliar o FPS de formulações com filtros físicos, pois não mostrará a eficácia desses filtros. Isso se deve ao fato tanto desses filtros não serem solúveis nos solventes usados, quanto de eles refletirem em sua maioria a luz ao invés de absorverem, apresentando, portanto pouca ou nenhuma absorbância.

Há também a dificuldade em se realizar o teste com o padrão para validar os resultados da metodologia de Mansur, visto que deve ser preparada uma formulação creme com 8% de homosalato, que seja solúvel nos solventes utilizados.

Deve-se então realizar mais estudos com essa metodologia, efetuando a mudança de solventes ou o desenvolvimento de métodos de solubilização completa desses filtros para que haja uma melhor reprodutibilidade dos resultados e para que eles sejam mais condizentes com o FPS real da formulação.

A metodologia da *COLIPA* apresentou resultados melhores do que a metodologia de Mansur, apesar das amostras em sua maioria não terem atingido os valores rotulados. Algumas das dificuldades encontradas com essa metodologia foram de pesagem da amostra e a aplicação dela igualmente nas placas, e o espalhamento uniforme do protetor nelas, fatores que dependem também do executor do teste.

A dificuldade em chegar no FPS que consta na embalagem em ambos os testes pode estar nas formulações utilizadas, que possuíam valores de fator de proteção mais altos (30 e 50), o que como mostrado por Mansur apresenta menor correlação entre o valor encontrado *in vitro* e o *in vivo*. Talvez para FPS menores essa metodologia funcione bem.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que a metodologia de COLIPA (2011) é melhor para a determinação de FPS de formulações de protetores solares, pois os valores encontrados para as formulações testadas utilizando esse método foram superiores aos obtidos com a realização dos testes utilizando o método de Mansur (1986). Esses dados experimentais confirmaram que o método de Mansur (1986) não deve ser utilizado para determinação do FPS de formulações que contenham filtros físicos, visto que eles não se solubilizam nos solventes utilizados. Levando em consideração que a grande maioria dos protetores solares que são vendidos atualmente possuem uma mistura de filtros físicos e químicos, a utilização desse teste fica inviabilizada.

Portanto pôde ser concluído que outros estudos são necessários para que haja segurança na substituição de métodos *in vivo* de determinação de FPS por métodos *in vitro*. Porém, já é possível que testes prévios *in vitro* sejam feitos com formulações antes de serem testadas em humanos para que sejam evitadas queimaduras nos voluntários.

Além disso, deve-se sempre analisar os protetores solares comercializados para conferir se o FPS indicado no rótulo é o mesmo que a formulação apresenta experimentalmente, a fim de que sejam tomadas medidas cabíveis às empresas cujo produto não atende às especificações. É importante também que seja verificado o FPS de formulações ao longo do tempo, do momento em que os protetores solares são abertos até o momento em que eles vencem, para que seja observada se está ocorrendo degradação dos filtros solares dentro da embalagem por ação dos componentes da formulação. Poderiam ser realizados um estudo de estabilidade acelerada e um de estabilidade de longa duração, ambos por um período de 6 meses, sendo realizados testes de pH, viscosidade, características físicas, solubilidade, quantificação dos filtros solares presentes nas formulações, e determinação de FPS tanto com o teste de COLIPA quanto com o de Mansur para detectar se há diferenças entre as medidas.

REFERÊNCIAS

BALOGH, T.S. et al. **Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção.** Anais Brasileiros de Dermatologia. São Paulo, v 86, n 4, p 732-742. 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº 30, de 4 de jun. de 2012. Aprova o **Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências.** Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº 107, Brasília, DF, 4 jun. 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº 69, de 23 de março de 2016. Dispõe sobre o **Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.** ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União nº 57, Brasília, DF, 24 mar. 2016.

CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O; PARTATA, A. K. **Filtros solares e fotoprotetores: uma revisão.** Revista Infarma: ciências farmacêuticas. Araguaína, v. 25, n 2, p 107-110, 2013.

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

DAHER, C.C. **Desenvolvimento de emulsões O/A contendo extrato glicólico de açaí e avaliação da atividade fotoprotetora.** 2014. 114f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2014.

DUTRA, E. A. et al. **Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v 40, n. 3, p 381-385, 2004.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Standard sunscreen. CFR - Code of Federal Regulations Title 21, chapter I, subchapter d, part 352, subpart D, sec. 352.70. Estados Unidos, abr. 2018. Disponível em <
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=352.70>>
Acesso em: 15/11/2018.

GONTIJO, G.T; PUGLIESI, M. C. C.; ARAÚJO F. M. **Fotoproteção: Artigo de revisão.** Surgical & Cosmetic Dermatology. Belo Horizonte, v 4, n 1, p 186-192. 2009.

HOLMAN, Dawn M. **Patterns of Sunscreen Use on the Face and Other Exposed Skin Among US Adults.** Journal of the American Academy of Dermatology. Atlanta, v 73, n 1, p 83–92, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tipos de câncer: pele não melanoma. 2018.** Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>
> Acesso em: 18/04/2018.

JESPERSEN, N. D. **Spectroscopic Evaluation of Sun Protection Factors of Sunscreen Preparations Using Dimethylsulfoxide as the Solvent**, Analytical Letters. Jamaica, v 22, n 1, p 293-304, 1989.

MANSUR, J. S. et al. **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria**. Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro. v.61, n.3, p.121-124, 1986.

MANSUR, J. S. et al. **Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria**. Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro, v 61, n 4, p.167-172, 1986.

MATTS, P.J. et al. **The COLIPA *in vitro* UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection**. International Journal of Cosmetic Science. Londres, v 32, n 1, p 35–46, 2010

MELO, M. M.; RIBEIRO, C. S.C. **Novas Considerações sobre a Fotoproteção no Brasil: Revisão de Literatura**. Revista Ciências em Saúde. Itajubá, v 5, n 3, 2015.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. **Fatores Determinantes da Eficácia de Fotoprotetores**. Caderno de Farmácia. Porto Alegre, v 18, n 2, p 81-87, 2002.

MOURA, C. A. **Protetor solar ganha novas regras**. ANVISA. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2666153&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=protetor-solar-ganha-novas-regras&inheritRedirect=true> Acesso em: 09/05/2018

PINHO, J. J. R. G. et al. **Determinação do fator de proteção solar (*in vitro*) de produtos magistrais na forma de gel: avaliação dos aspectos sensoriais e físico-químicos**. HU Revista. Juiz de Fora, v. 40, n. 1 e 2, p. 79-86, 2014.

PROTESTE. **Protetores solares**. 2018. Disponível em: <<https://www.proteste.org.br/saude-e-bem-estar/cuidados-com-a-pele/teste/protetor-solar/results>> Acesso em: 24/10/2018.

RASCHE, W. D. **Formulação e Análise de Gel-creme Hidratante Facial**. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário Univates, Rio Grande do Sul, 2014.

RIBEIRO, R.P. **Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de Filtros Solares e Determinação do FPS *in vitro* em Formulações Fotoprotetoras Comerciais**. 2004. 86f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SAYRE, R.M.; AGIN, P.P.; LEEVEE, G.J; MARLOWE, E. **A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas**. Photochemistry and Photobiology. Grã Bretânia, v 29, p 559-566, 1978.

SCHALKA, S.; ADDOR, F. **Protetores solares: Sunscreens**. Revista Brasileira de Medicina - Especial Dermatologia e Cosmiatria. São Paulo, v 65, 2008

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

SCHALKA, S. et al. **Consenso Brasileiro de Fotoproteção**. Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro, v 89, n 6 Supl 1, p 6-75, 2014.

SKOOG, D; HOLLER, F.; NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Tradução da 5ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. et al. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2006

SURMAN, L. L. et al. **Potencialidades de Veículos Microemulsionados para Fotoprotetores Físicos**. Latin American Journal of Pharmacy. v 28, n 1, p 133-40, 2009.

VELASCO, M. V. R. et al. **Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*): revisão**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. São Paulo, v 32, n 1, p 27-34, 2011.