

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

*Sérgio Luiz de Oliveira*

PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS  
- ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO A  
TÉCNICA FOTOACÚSTICA.

São José dos Campos, SP

2006

*Sérgio Luiz de Oliveira*

PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS  
- ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO A  
TÉCNICA FOTOACÚSTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roxo Barja

**São José dos Campos, SP  
2006**

O51p

Oliveira, Sérgio Luiz de

Previsão do fator de proteção solar de formulações cosméticas - estudo de otimização de protocolo utilizando a técnica fotoacústica / Sérgio Luiz de Oliveira. São José dos Campos: UniVap, 2005.

115f.: il.; 30cm.

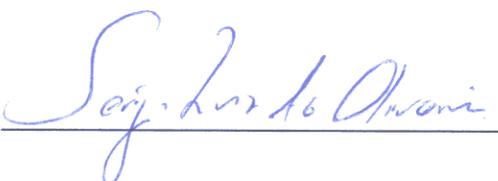
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

I. Fotoacústica 2. Protetores solares 3. Pele I. Barja, Paulo Roxo, Orient. II. Título

CDU: 616.5

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

ASSINATURA DO ALUNO:



São José dos Campos, 25 de agosto de 2006

**“PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS – ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO A TÉCNICA FOTOACÚSTICA”**

Sérgio Luiz de Oliveira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. MAIRA REGINA RODRIGUES MAGINI (UNIVAP)

*Maira R.R. Magini*

Prof. Dr. PAULO ROXO BARJA (UNIVAP)

*Paulo Roxo Barja*

Prof. Dr. RENATO AMARO ZÂNGARO (UNIVAP)

*Renato Amaro Zângaro*

Prof. Dr. ANTONIO MANOEL MASSANARES (UNICAMP)

*Antonio Manoel Massanares*

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap

## **Dedicatória**

*À minha mãe, Iracy.*

## **Agradecimentos**

Ao Deus Jeová, a nascente de todo conhecimento.

À minha mãe, que me ensinou com atitudes e ternura o sentido maior do amor. Que Deus tenha para ti a reserva de Teus filhos amados! Sinto muitíssimo sua falta.

Ao meu pai, que bem cedo me ensinou o valor da responsabilidade, do trabalho e da persistência e sempre me apoiou.

Às minhas filhas Nina, Marina e Laura, pela paciência e pelos momentos em que não pude estar presente.

À Daniela, minha querida, pela valiosa ajuda ainda acompanhada de todo amor e carinho.

Ao Professor Dr. Paulo Barja, meu orientador, pelas excelentes discussões, apoio, confiança, incentivos animadores e por estar entre aqueles que escolheram para si a participação na perpetuação do conhecimento.

Às secretárias, Ivone, Valéria e Aline, pela ótima disposição em ajudar em minhas muitas solicitações.

A todos os meus anteriores “mestres”, cujos ensinamentos pavimentaram meu caminho.

Ao Presidente de Pesquisa e Desenvolvimento da Johnson & Johnson, Gerson Pinto, pela confiança e aprovação de minha bolsa.

À minha gestora na Johnson & Johnson, Rosana Neves, pelo apoio e incentivo e exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Edson Corrêa da Silva, Prof. Dr. Antonio Mansanares e demais componentes da equipe do Laboratório de Fototérmica e Ressonância Magnética do Instituto de Física *Gleb Wataghin* da UNICAMP, pela abertura e disponibilização do laboratório para a execução da análise fotoacústica.

A todos, muito obrigado.

## "ÍTACA"

"Se partires um dia rumo a Ítaca  
faz votos de que o caminho seja longo,  
repleto de aventuras, repleto de saber.  
Nem os Lestrigões nem os Ciclopes  
nem o colérico Posídon te intimidem;  
eles no teu caminho jamais encontrarás  
se altivo for teu pensamento, se sutil  
emoção teu corpo e teu espírito tocar.  
Nem Lestrigões nem os Ciclopes  
nem o bravo Posídon hás de ver,  
se tu mesmo não o lebares dentro da alma,  
se tua alma não os puser diante de ti.  
Faz votos de que o caminho seja longo.  
Numerosas serão as manhãs de verão  
nas quais, com que prazer, com que alegria,  
tu hás de entrar pela primeira vez um porto  
para correr as lojas dos fenícios  
e belas mercancias adquirir:  
madrepérolas, corais, âmbar, ébanos,  
e perfumes sensuais de toda espécie,  
quando houver, de aromas deleitosos.  
A muitas cidades do Egito peregrina  
para aprender, para aprender dos doutos.  
Tem todo o tempo Ítaca na mente.  
Estás predestinado a ali chegar.  
Mas não apresses a viagem nunca.  
Melhor muitos anos lebares de jornada  
e fundeares na ilha, velho enfim,  
rico de quanto ganhaste no caminho,  
sem esperar riquezas que Ítaca te desse.  
Uma bela viagem deu-te Ítaca.  
Sem ela não te porias a caminho.  
Mais do que isso, não lhe cumpre dar-te.  
Ítaca não te iludiu, se a achas pobre.  
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência,  
e agora sabes o que significam Ítacas."

*Konstantinos Kaváfis*  
(tradução de José Paulo Paes)

PREVISÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS  
- ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO A TÉCNICA  
FOTOACÚSTICA.

RESUMO

A previsão do fator de proteção solar (FPS) e a investigação da eficácia de filtros de ultravioleta (UV) são de fundamental importância para a indústria cosmética. O desenvolvimento de novas metodologias *in vitro* eficientes nessas investigações é condição essencial para a evolução da qualidade dos protetores solares. O teste mais adequado para determinar a eficácia de um protetor solar é a determinação do FPS *in vivo* (em humanos), seguindo diretrizes validadas e internacionalmente aceitas, como aquelas regulamentadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e pela *The European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association* (COLIPA) na Europa. Porém, devido a razões como alto custo, tempo envolvido e características invasivas das metodologias *in vivo*, busca-se atualmente desenvolver e aprimorar técnicas *in vitro* capazes de prever o FPS *in vivo* durante o desenvolvimento do produto, de forma rápida e barata. O estudo aqui apresentado avalia: a) dois diferentes substratos sintéticos comercialmente disponíveis para utilização em metodologias *in vitro*: a folha VitroSkin®, pele sintética que simula a pele humana quanto às propriedades químicas e físicas e a placa de poli(acrilato de metila) (PMMA), substrato que apresenta importantes vantagens para utilização em metodologias *in vitro* de determinação das propriedades ópticas de produtos e matérias-primas absorvedores de UV; b) a correspondência entre os valores de FPS obtidos por duas técnicas de medidas *in vitro*, a espectroscopia fotoacústica e a espectroscopia de absorção acoplada a detector com esfera de integração; e c) a correlação entre os resultados de FPS *in vitro* obtidos a partir dessas duas técnicas e os resultados de FPS determinados em humanos e declarados nos rótulos de quatro produtos protetores solares de diferentes valores de FPS comercialmente disponíveis no mercado brasileiro.

Palavras-chave: **Espectroscopia fotoacústica, proteção solar, FPS, pele sintética, PMMA.**

## PREDICTING THE SOLAR PROTECTION FACTOR OF COSMETIC FORMULAS – PROTOCOL OPTIMIZATION STUDY USING PHOTOACUSTIC TECHNIQUE.

### Abstract

Predicting the solar protection factor (SPF) and investigating the efficacy of ultraviolet (UV) filters are extremely important items for the cosmetic industry. The development of new and efficient *in vitro* methodologies for these investigations is an essential condition for the evolution of the quality of sunscreens. The most adequate test for assessing the efficacy of sunscreens is the *in vivo* (in humans) SPF determination, following validated and worldwide accepted methodologies like those regulated by the *Food and Drug Administration* (FDA) in the United States and *The European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association* (COLIPA) in Europe. However, due to some reasons like the high costs, time consumption and invasive characteristics of the *in vivo* SPF determination, the constant development of *in vitro* techniques able to predict the *in vivo* SPF during the product development phase with rapid and cheap methods is very important. The study here presented evaluates: a) two different synthetic substrates commercially available and applicable for *in vitro* methodologies, the VitroSkin® sheet, a synthetic skin that mimics the humans skin regard to its chemical and physical properties and the poli(methyl metacrylate) (PMMA) plate, a substrate that presents important advantages for the determination of the optical properties of products and raw materials UV absorbers; ) the correspondence between SPF values determined by two *in vitro* techniques, the photoacoustic spectroscopy and the absorption spectroscopy with an integration sphere detector; and c) the correlation between the *in vitro* SPF results from these two *in vitro* techniques and the SPF results determined in humans and declared in the labels of four commercially available sunscreens of different SPF values from Brazilian market.

**Keywords:** Photoacoustic Spectroscopy, solar protection, SPF, synthetic skin, PMMA.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO   | 17 |
| 2. A LUZ  | 21 |
| 3. A PELE   | 25 |
| 3.1. A epiderme   | 27 |
| 3.2. A derme  | 30 |
| 3.3. Pigmentação cutânea  | 31 |
| 4. A LUZ E A PELE   | 34 |
| 4.1. Luz solar e pigmentação da pele humana   | 41 |
| 4.2. Melanina e inflamação da pele  | 43 |
| 4.2.1. Células com queimaduras de sol e o gene p53  | 46 |
| 4.3. O efeito do sol na pele em médio e longo prazo   | 46 |
| 4.3.1. Efeitos Imunológicos   | 49 |
| 4.4. Proteção solar   | 50 |
| 5. TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DA FOTOPROTEÇÃO   | 56 |
| 5.1. Metodologias <i>in vivo</i>  | 57 |
| 5.1.1. Método FDA-1993 para a determinação do FPS e da resistência a água de protetores solares | 59 |
| 5.1.2. Método COLIPA-1994 para a determinação do FPS de protetores solares                      | 61 |
| 5.1.3. Método FDA 1999 para a determinação do FPS e da resistência a água de protetores solares | 64 |
| 5.1.4. Método Internacional COLIPA, JCIA e CTFA-AS – 2003 para determinação do FPS.             | 64 |
| 5.1.5. Método IPD para a determinação da proteção UVA de protetores solares                     | 70 |

|   |    |
|---|----|
| 5.1.6. Método PPD para a determinação da proteção UVA de protetores solares                   | 70 |
| 5.2. Metodologias <i>in vitro</i>   | 71 |
| 5.2.1. A espectroscopia de absorção e/ou transmissão  | 71 |
| 5.2.1.1. Transmitância e Absorbância  | 73 |
| 5.2.2. Medida do FPS <i>in vitro</i> via espectroscopia de absorção e/ou transmissão          | 76 |
| 5.2.3. Medida da proteção UVA <i>in vitro</i> via espectroscopia de absorção e/ou transmissão | 78 |
| 5.2.3.1. Fator de proteção UVA médio  | 79 |
| 5.2.3.2. Fator de proteção UVA eritematoso  | 79 |
| 5.2.3.3. Razão entre absorbância UVA e absorbância UVB  | 80 |
| 5.2.3.4. Amplitude da proteção UVA pela determinação do “comprimento de onda crítico”         | 81 |
| 5.2.4. A espectroscopia fotoacústica  | 82 |
| 6. OBJETIVO   | 87 |
| 7. MATERIAL E MÉTODOS   | 89 |
| 7.1. Produtos estudados   | 90 |
| 7.2. Substratos   | 91 |
| 7.3. Montagem experimental  | 92 |
| 7.3.1. Espectrofotômetro de absorção  | 92 |
| 7.3.2. O espectrofotômetro fotoacústico   | 94 |
| 7.4. Procedimento experimental  | 95 |
| 7.4.1. Medidas com espectroscopia de absorção com detector de esfera de integração            | 95 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.4.2. Medidas com espectroscopia fotoacústica   | 95  |
| 7.4.3. Cálculos  | 96  |
| 7.4.3.1. Cálculo do FPS a partir das curvas de absorção  | 96  |
| 7.4.3.2. Cálculo do FPS a partir das curvas de sinal fotoacústico                                | 96  |
| 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 98  |
| 8.1. Resultados para a espectroscopia de absorção com substrato pele sintética VitroSkin®        | 99  |
| 8.2. Resultados para a espectroscopia de absorção com substrato PMMA                             | 101 |
| 4.2.1. Sinal fotoacústico em função do tempo, utilizando lâmpada de tungstênio como fonte de luz |     |
| 8.3. Resultados para espectroscopia fotoacústica com substrato VitroSkin®                        | 104 |
| 9. CONCLUSÕES E PERSPECTATIVAS   | 107 |
| REFERÊNCIAS  | 110 |

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| FIGURA 1.  | Representação das camadas da pele  | 26  |
| FIGURA 2.  | Seção histológica das camadas da pele  | 27  |
| FIGURA 3.  | Representação das camadas da epiderme  | 28  |
| FIGURA 4.  | Seção histológica das camadas da epiderme  | 28  |
| FIGURA 5.  | Tempos máximos de exposição solar em função do índice UV   | 39  |
| FIGURA 6.  | Espectro de ação eritematosa   | 77  |
| FIGURA 7.  | Espectro de irradiância para simulador solar   | 77  |
| FIGURA 8.  | Produto do espectro de ação eritematosa ( $E_{\lambda}$ ) pela irradiância espectral ( $S_{\lambda}$ )   | 78  |
| FIGURA 9.  | Esquema de funcionamento de um sistema de detecção com esfera de integração  | 92  |
| FIGURA 10. | Configuração iluminação/detecção $d/0^{\circ}$ empregada no UV1000S  | 93  |
| FIGURA 11. | Ilustração esquemática da montagem fotoacústica - Laboratório de Fototérmica e Ressonância Magnética do Instituto de Física <i>Gleb Wataghin</i> (IFGW), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) | 94  |
| FIGURA 12. | Curva média de absorção para substrato VitroSkin <sup>®</sup> na concentração de $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$  | 99  |
| FIGURA 13. | Curva de absorção média para substrato VitroSkin <sup>®</sup> na concentração de $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$  | 100 |
| FIGURA 14. | Curva de absorção média para substrato PMMA na concentração de $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$  | 102 |
| FIGURA 15. | Curva de absorção média para substrato PMMA na concentração de $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$ .  | 102 |
| FIGURA 16. | Curva média de sinal fotoacústico para substrato VitroSkin <sup>®</sup> na concentração de $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$ .  | 104 |
| FIGURA 17. | Curva média de sinal fotoacústico para substrato VitroSkin <sup>®</sup> na concentração de $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$  | 105 |

## LISTA DE TABELAS

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| TABELA 1.  | Classificação do espectro eletromagnético   | 22  |
| TABELA 2.  | Classificação dos fototipos de pele segundo Fitzpatrick   | 33  |
| TABELA 3.  | Categorias do Índice Ultravioleta   | 37  |
| TABELA 4.  | Tempos máximos de exposição solar em função do índice UV  | 38  |
| TABELA 5.  | Designação de categoria de produto conforme monografia FDA 1993.  | 60  |
| TABELA 6.  | Categorias de cor da pele em função do ITA <sup>o</sup>   | 62  |
| TABELA 7.  | Classificação de protetores solares segundo norma COLIPA 1994   | 63  |
| TABELA 8.  | Comparação das Principais Metodologias Para Teste e Rotulagem de Protetores Solares   | 66  |
| TABELA 9.  | Classificação da proteção UVA segundo sistema <i>Boots Star Rating</i>  | 80  |
| TABELA 10. | Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico  | 82  |
| TABELA 11. | Teor de filtros uv empregados nos produtos estudados  | 91  |
| TABELA 12. | Resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin <sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup> .  | 100 |
| TABELA 13. | Ajuste linear para resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin <sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup> versus FPS declarado em rótulo  | 101 |
| Tabela 14. | Resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup>  | 103 |
| TABELA 15. | Ajuste linear para resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup> versus FPS declarado em rótulo                    | 103 |
| TABELA 16. | Resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato VitroSkin <sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup> .   | 105 |
| TABELA 17. | Ajuste linear para resultados de FPS <i>in vitro</i> médio determinados por espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato VitroSkin <sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm <sup>2</sup> versus FPS declarado em rótulo | 106 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A: absorvância
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AS/NZS: *Australian and New Zealand Standard*
- AVO: Avobenzona
- $c$ : velocidade da luz
- CFC: clorofluorocarbonetos
- $\text{cm}^2$  : centímetro quadrado
- COLIPA: *European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association*
- CPTEC: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos
- CTFA: *Cosmetic, Toiletries and Frarance Association*
- CTFA-AS: *Cosmetic, Toiletries and Frarance Association of South Africa*
- DCP: Designação da Categoria do Produto
- DNA : Ácido desoxiribonucleico
- $f$ : frequência
- E: Energia
- EUA: Estados Unidos da América
- FDA: Food Drug Administration
- FPM: fator de proteção monocromático
- FPS : Fator de proteção solar
- $h$ : constante de Planck
- h : Horas
- Hz : Hertz
- INPE: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
- IP: índice de proteção
- IPD: *immediate pigment darkening*
- $\text{ITA}^\circ$ : do ângulo tipológico individual
- IUV : Índice ultravioleta
- IV: infravermelho
- J : Joules
- JCIA: *Japan Cosmetic Industry Association*

- m: metro
- m<sup>2</sup> : metro quadrado
- MDE : Mínima dose eritematosa
- MDPsp: mínima dose pigmentária sem produto
- MDPp: mínima dose pigmentária com produto
- ml : mililitro
- mm : milímetro
- mm<sup>2</sup> : milímetro quadrado
- nm : nanômetro
- N: norte
- OMC: Metoxicinamato de octila
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- OTC: *over-the-counter* – medicamento de venda livre
- OXI: Oxibenzona
- PA : Fotoacústica
- PBIS: ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfônico
- pH: potencial de hidrogênio iônico
- PMMA: poli(metacrilato de metila)
- PPD: *persistent pigment darkening*
- s: segundos
- T: transmitância
- u.a. : unidade arbitrária
- UV : Ultravioleta
- UVA : Ultravioleta A
- UVB : Ultravioleta B
- UVC : Ultravioleta C
- Vis: visível
- W : Watts
- λ: comprimento de onda
- µl : microlitro
- µm : micrômetro



## 1. INTRODUÇÃO

A previsão do fator de proteção solar (FPS) e a investigação do efeito da concentração e combinação de ingredientes absorvedores de ultravioleta (UV) são de fundamental importância para a indústria cosmética. O desenvolvimento de metodologias eficientes nessas investigações não só auxilia a indústria durante o controle e desenvolvimento de formulações cosméticas de protetores solares como terá papel fundamental na evolução da qualidade de tais produtos que, cada vez mais, contêm menores concentrações de filtros com maior eficiência e estabilidade.

A forma mais universalmente aceita para avaliação do nível de proteção de um protetor solar é, sem dúvida, aquela que emprega humanos e considera respostas biológicas associadas à proteção que se deseja medir. Dentre as normas mais divulgadas e utilizadas para a determinação do FPS de um produto, estão aquelas recomendadas pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (FDA, 1993) pela *European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association* (COLIPA) na Europa (COLIPA, 1994) ou ainda pela *Japan Cosmetic Industry Association* (JCIA) no Japão (JCIA, 1991). Como alternativa de baixo custo e alta velocidade, a determinação *in vitro* do FPS dos protetores solares vem sendo utilizada há aproximadamente 25 anos. Uma considerável variedade de instrumentos, substratos e diferentes técnicas de preparação de amostras têm sido empregadas (COLE, 2001, STOKES; DIFFEY, 1999).

As metodologias *in vitro* apresentam vantagens quanto à economia e velocidade; no entanto, são por vezes deficitárias na exatidão da previsão da amplitude da proteção. Como exemplo, a espectroscopia de soluções diluídas de protetores solares é útil para a determinação da qualidade da proteção, porém, não raro, apresenta falha de correlação com a performance do produto aplicado à pele humana (COLE, 2000)

Deve-se ainda mencionar a informação, já bem difundida, de que os protetores solares não obedecem a Lei de Beer-Lambert sobre a absorbância em filmes finos, quando aplicados sobre uma superfície não homogênea, como é o caso da pele humana. Ao se determinar a absorbância em formatos de filmes finos, por exemplo na concentração de  $2\text{mg}/\text{cm}^2$ , as propriedades ópticas são determinadas por vários fatores, como a rugosidade da superfície do substrato, a extensão da permeação dos filtros no

substrato utilizado, a força utilizada na aplicação durante o cisalhamento do produto sobre o substrato e ainda o grau de interação dos ingredientes do produto com a superfície do substrato em uso e como esta interação afeta a qualidade da uniformidade do filme protetor formado (COLE, 2001). Todas essas variáveis contribuem para uma alta variabilidade nas medidas absolutas da absorbância de protetores solares, ainda que dentro de um mesmo laboratório. A própria construção e configuração do equipamento utilizado pode originar variabilidade nos resultados. Por essas razões, as metodologias *in vitro* ainda não são universalmente aceitas como única forma de se quantificar a proteção aos raios UV.

Os instrumentos acoplados com dispositivos de integração esféricos imediatamente após a amostra em teste são as melhores construções para a obtenção de medidas *in vitro* apropriadas da eficácia de um protetor solar no formato de filme fino (AUSTRALIAN STANDARD, 1998; GERMAN STANDARD DIN, 2004).

Dentre as técnicas *in vitro* e *in vivo* não invasivas, a espectroscopia fotoacústica tem se mostrado bastante promissora (BALASUBRAMANIAN; RAO, 1986; KÖMEL; SENNHENN; GIESE, 1986; SEHN *et al.*, 2003; ANJOS *et al.*, 2004). O efeito fotoacústico consiste na geração de ondas acústicas e efeitos termoelásticos a partir da absorção de radiação modulada por uma amostra. A técnica fotoacústica permite obter informação sobre propriedades térmicas e ópticas dos materiais, bem como monitorar a cinética de processos que impliquem na alteração dessas propriedades.

A técnica fotoacústica constitui uma opção experimental com muitas aplicações no estudo de propriedades ópticas como absorção e transmissão de radiação eletromagnética. Diversos materiais biológicos, como membranas, amostras de ossos ou estruturas de tecidos são dificilmente solubilizados e apresentam dificuldades para análise por técnicas convencionais, pois são fortemente alterados quando submetidos a tais processos de preparação, como a solubilização. A técnica fotoacústica permite a análise de tecidos biológicos intactos, tornando-se assim, uma importante ferramenta de pesquisa na biomedicina e na biologia. Outra vantagem da fotoacústica é permitir a análise das propriedades ópticas de amostras que apresentam excessivo espalhamento de luz, bem como de amostras opacas, além de ser um método não destrutivo que fornece informação qualitativa e quantitativa sobre o material em análise. As propriedades de

absorção molecular de um material são normalmente estudadas através dos seus coeficientes de transmissão ou reflexão de determinada radiação, enquanto a fotoacústica é baseada na absorção direta da luz incidente. Assim, a técnica fotoacústica pode ser empregada na caracterização de materiais opacos e sistemas biológicos complexos (ANJOS *et al.*, 2004).

Com a crescente preocupação sobre os efeitos deletérios da exposição da pele humana à radiação ultravioleta incidente na superfície terrestre (290 a 400nm), torna-se vital a intensificação da exploração de técnicas *in vitro* capazes de caracterizar as propriedades dos protetores solares, isoladamente ou sobre a pele humana. Dentre as razões para constante busca de metodologias eficazes na avaliação *in vitro* de protetores solares, podemos citar: a) a crescente demanda por produtos com FPS mais altos; b) a crescente demanda por protetores solares de amplo espectro de proteção (UVB + UVA); c) a necessidade de manutenção da fotoestabilidade do produto, d) a necessidade da redução da concentração de filtros solares orgânicos na composição dos produtos, minimizando possíveis reações adversas.

A geração de novas técnicas *in vitro* para avaliação da qualidade da proteção solar encontra, assim, um vasto terreno de aplicação e altíssimo potencial de contribuição no âmbito da saúde pública. A contribuição de técnicas como a fotoacústica nesse campo de pesquisa permitirá fornecer informações mais completas sobre o produto em avaliação.



## 2. A LUZ

A luz é uma radiação eletromagnética, ou seja, é constituída por campos elétricos e magnéticos oscilantes que se propagam à velocidade de 300.000 km/s. Essa velocidade é constante no vácuo e é representada pela letra  $c$  (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

A luz é caracterizada pelo seu comprimento de onda  $\lambda$  ou por sua frequência  $f$  (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002). A intensidade da luz é proporcional ao quadrado da amplitude da onda. O campo elétrico da radiação eletromagnética oscila no tempo e no espaço (ATKINS; JONES, 1999).

O espectro eletromagnético é dividido e classificado de acordo com o comprimento de onda, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Classificação do espectro eletromagnético

| <i>Nome da Radiação</i> | <i>Comprimento de onda (m)*</i>             | <i>Tipo de excitação</i> |
|-------------------------|---|--------------------------|
| Rádio                   | 1 a $10^{-1}$                               | Rotação molecular        |
| Micro-ondas             | $10^{-1}$ a $10^{-3}$                       | Rotação molecular        |
| Infravermelho distante  | $10^{-3}$ a $10^{-5}$                       | Vibração molecular       |
| Infravermelho próximo   | $10^{-5}$ a $10^{-6}$                       | Vibração molecular       |
| Visível                 | $7,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ | Excitação eletrônica     |
| Ultravioleta A          | $4,0 \times 10^{-7}$ a $3,2 \times 10^{-7}$ | Excitação eletrônica     |
| Ultravioleta B          | $3,2 \times 10^{-7}$ a $2,9 \times 10^{-7}$ | Excitação eletrônica     |
| Ultravioleta            | $2,9 \times 10^{-9}$ a $10^{-9}$            | Excitação eletrônica     |
| Raios X                 | $10^{-9}$ a $10^{-12}$                      | Excitação eletrônica     |
| Raios $\gamma$          | $10^{-12}$ a $10^{-13}$                     | Excitação nuclear        |
| Raios cósmicos          | $10^{-13}$ a $10^{-14}$                     | Excitação nuclear        |

\*Os valores que delimitam as faixas de cada tipo de radiação são aproximados.

Fonte: ATKINS, 1994.

Pode-se notar que diferentes frequências de radiação são absorvidas ou emitidas por diferentes tipos de movimentos eletrônicos ou moleculares (ATKINS, 1994).

A relação entre frequência ( $f$ ) e comprimento de onda ( $\lambda$ ) é dada por

$$f = c/\lambda \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Sendo a velocidade da luz  $c$  constante, pode-se deduzir que  $\lambda$  e  $f$  são inversamente proporcionais. Quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência. A cada valor de frequência está associado um nível de energia medido em Joule (J). A proporcionalidade entre a energia ( $E$ ) e a frequência da onda é dada por:

$$E = h.f \quad (\text{Eq.2.2})$$

onde:

$$h = 6,63 \times 10^{-34} \text{Js} \quad (\text{constante de Planck}) \quad (\text{Eq.2.3})$$

$E$ = energia irradiada

Das equações (1.1) e (1.2), obtemos:

$$E = hc/\lambda \quad (\text{Eq.2.4})$$

Assim, quanto maior for a frequência (ou menor for o comprimento de onda) de determinada radiação, maior será sua energia.

Da radiação emitida pelo sol, as faixas de comprimento de onda de interesse para estudos em sistemas biológicos são: a radiação ultravioleta (UV), a radiação visível e a radiação correspondente ao infravermelho (IV). O espectro solar terrestre é a soma dessas três faixas que chegam à superfície do planeta na proporção de, aproximadamente, 50% de IV, 45% de visível e 5% de UV.

A radiação na região do infravermelho é responsável pelo calor do sol que chega à Terra e, quando incide sobre a matéria, provoca aumento de temperatura.

A radiação ultravioleta é a região do espectro eletromagnético emitido pelo Sol compreendida entre os comprimentos de onda de 100 e 400nm. Devido aos importantes

efeitos fisiológicos causados em seres vivos, esta radiação é de profundo interesse na área de fotobiologia (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

O espalhamento da luz depende do comprimento de onda. Comprimentos de onda menores são espalhados mais facilmente que comprimentos de onda maiores. Apenas como exemplo, na atmosfera terrestre, a luz azul é espalhada dez vezes mais que a luz vermelha. Em resultado disto, quando a radiação solar viaja através da atmosfera para a terra, os comprimentos de onda menores são espalhados em todas as direções. A radiação de comprimentos de onda curtos faz com que o céu fique da cor azul (PUGLIESE, 2001).

A maioria das moléculas orgânicas absorve luz UV. A água não é uma molécula orgânica, mas apresenta forte absorção da radiação UV de comprimento de onda inferior de 150nm. A maior parte do espectro solar na região do UV é absorvida pela camada de ozônio presente na atmosfera (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).



### 3. A PELE

A pele é o maior órgão do corpo, pesando por volta de 4 quilos e cobrindo uma superfície de cerca de 1,5 a 2 metros quadrados (HAWK; MCGREGOR, 2001). Trata-se do maior órgão sensorial do corpo humano, capaz de detectar várias sensações como dor, pressão, coceira, toque, calor, frio (PUGLIESE, 2001).

Existem dois tipos de pele no corpo humano: a pele fina, de espessura média aproximada de 1mm e presente na maior parte do corpo; e a pele grossa; de até 4mm de espessura, que não tem pêlos e apresenta epiderme mais espessa, oferecendo maior proteção. A pele grossa é encontrada nas palmas das mãos, nas plantas dos pés e nas pontas dos dedos, áreas relacionadas com o movimento de manipulação e que, portanto, têm mais necessidade de resistir à abrasão. A pele fina contém pêlos, cobre o resto do corpo e não possui o estrato lúcido, presente na pele grossa (McCRACKEN; WALKER, 2001). A pele é constituída de duas camadas principais: a epiderme e a derme. A pele com seus apêndices é representada de forma esquemática na figura 1 e através de uma seção histológica na figura 2.

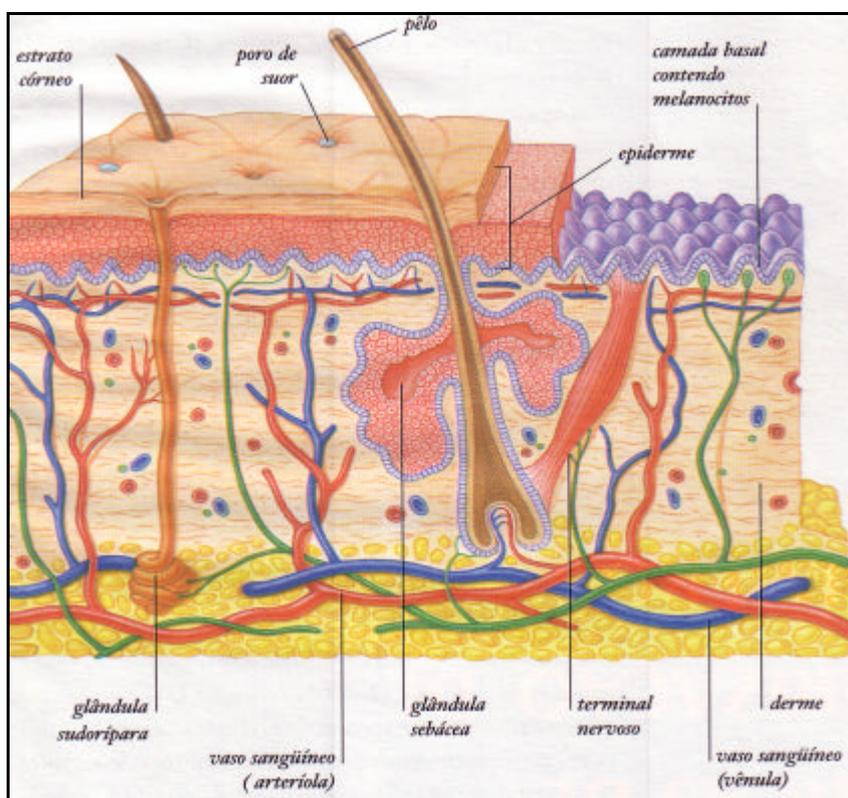


Figura 1. Representação esquemática das camadas da pele

Fonte: Hawk; McGregor(2001)



Figura 2. Seção histológica da pele  
Fonte: Kollias,(2002)

### 3.1 A epiderme

A epiderme, mais superficial que a derme, contém vários corpos celulares, tem função protetora contra a água, a luz do sol, os insetos, os germes, o calor e o frio, a sujeira e os gases, e contém fluidos como o sangue e a água. Além disso, a epiderme mantém protegidos os minerais, as vitaminas, os hormônios, as proteínas e o calor. A epiderme constitui-se de uma série de camadas também denominadas estratos, dispostas como mostra a representação na figura 3. A camada mais externa é o estrato córneo (sc); abaixo do estrato córneo fica o estrato granuloso (g); abaixo deste está o estrato espinhoso (s) e, abaixo deste último, o estrato basal (b) (SHAEFER; REDELMEIER, 1996). A figura 4 apresenta uma seção histológica da pele evidenciando estas camadas. É na epiderme que se encontram os melanócitos, células que produzem a melanina, substância natural responsável pela pigmentação da pele (WINSTON, 2004; OKUNO; VILELA, 2005).

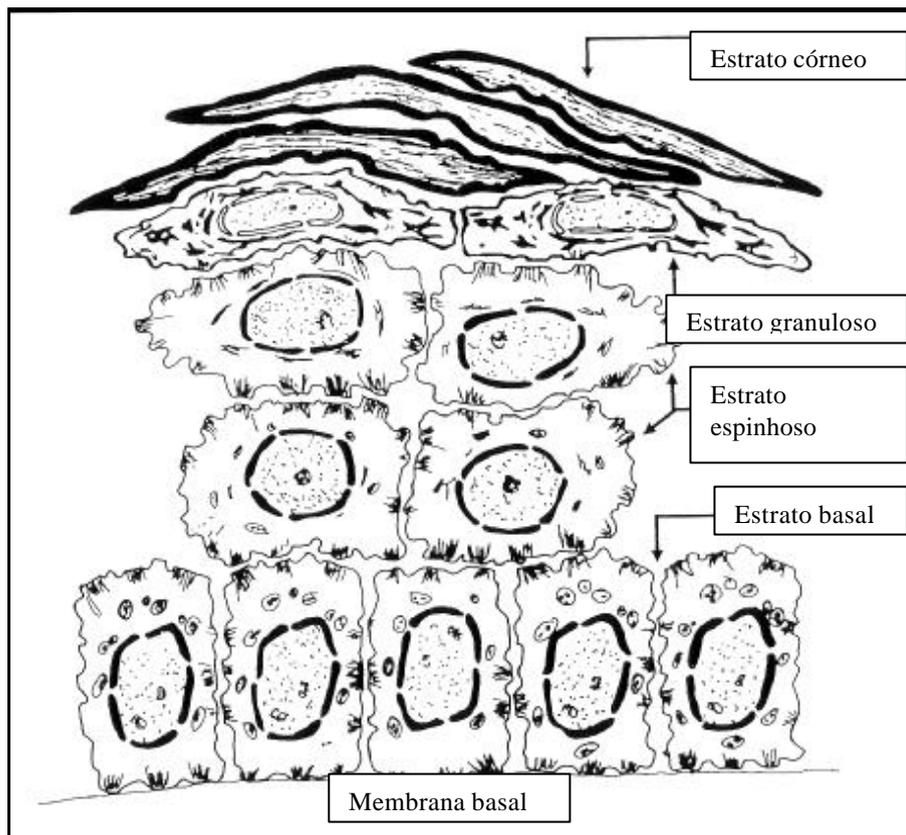


Figura 3. Representação esquemática das camadas da pele

Fonte: Hawk e McGregor, (2001)

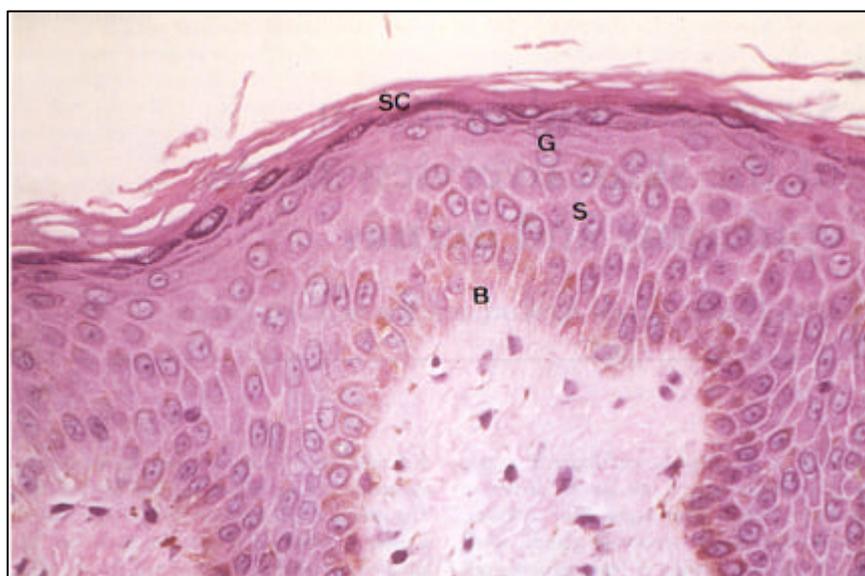


Figura 4. Seção histológica da epiderme

Fonte: Kollias(2002)

O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, tem espessura entre 15 e 150 micrômetros, possuindo em geral espessura menor que a de um fio de cabelo. Sem essa fina, porém resistente camada, a pele pereceria. O estrato córneo é formado por células mortas, planas e envoltas em queratina. A queratina é uma proteína em forma helicoidal, resistente às substâncias químicas e à prova d'água. Esse polipeptídeo varia nas diferentes partes do corpo, por isso, a pele é heterogênea quando considerada ao longo do corpo humano. A queratina também é encontrada no cabelo e nas unhas. Como o estrato córneo se desgasta e é eliminado constantemente à medida que a pele se descama, as células vivas que se encontram na camada mais profunda da epiderme, o estrato basal, dividem-se para substituir essas células. À medida que são empurradas para a superfície através de outros estratos, vão se aplanando, enchem-se de queratina e morrem.

A produção de proteínas é uma das funções mais importantes da pele. Essas proteínas são formadas a partir de um outro importante componente do estrato córneo, os lipídeos. Os lipídeos são substâncias oleosas e insolúveis em água e podem ser classificados em relação à sua carga elétrica e à sua estrutura. Os dois principais grupos de lipídeos são os lipídeos polares (que possuem carga elétrica), como os fosfolipídeos, glicolipídeos e o colesterol e os lipídeos apolares. Os lipídeos apolares não possuem momento de dipolo elétrico; alguns exemplos são os esqualenos, as ceras e os triglicérides. Outras células na epiderme profunda, os melanócitos, alojados na camada basal, são os responsáveis pela produção e distribuição de grânulos de melanina, que desempenham um importante papel na proteção contra os efeitos nocivos dos raios UV (OKUNO; VILELA, 2005).

Diretamente abaixo do estrato córneo está a epiderme estratificada, composta primeiramente de 10 a 20 camadas de células de queratinização epitelial. Essas camadas são responsáveis pela síntese do estrato córneo. A epiderme estratificada também contém: i) melanócitos; ii) células de Langerhans, importantes para as respostas imunológicas; iii) células de Merkel, que têm um papel ainda não totalmente explicado

na recepção sensorial; iv) fibras nervosas, que permeiam a epiderme e contatam os corpos celulares dos queratinócitos por justaposição membrana a membrana; v) células “T”, glóbulos brancos responsáveis pela imunidade do corpo; e vi) neutrófilos, que podem penetrar na epiderme durante condições patológicas como *psoriasis vulgaris*. Essas células têm um papel significativo e influenciador na biologia do queratinócito, relevante para as respostas epidérmicas em vários processos patológicos (SHAEFER; REDELMEIER, 1996).

Com a derme, a epiderme promove a regulação do calor para todo o corpo através do controle da evaporação de suor e do controle do fluxo sanguíneo que ocorre na derme. Um sistema de auto-renovação promove a substituição das células mais externas que são perdidas para o meio ambiente, podendo assim livrar o corpo de substâncias tóxicas (PUGLIESE, 2001).

### **3.2 A derme**

A derme contribui com mais de 90% da massa da pele e com a maior parte da resistência mecânica. A derme, mais espessa que a epiderme, é uma camada flexível e resistente, incrustada de fibras de colágeno e elastina, que lhe dão elasticidade e flexibilidade. Também contém terminais e receptores nervosos sensoriais, vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas (que produzem a transpiração e a eliminam através de condutos na superfície da pele), folículos pilosos (cavidades profundas onde crescem os pêlos) e as glândulas sebáceas, que segregam um líquido oleoso chamado sebo, que ajuda a manter a maciez e a flexibilidade da pele e dos pêlos (McCRACKEN; WALKER, 2001).

As principais divisões da derme são a camada papilar e a camada reticular. A derme papilar é a parte mais externa da derme e fica em contato direto com a epiderme. Essa camada é fina e contém pequenas fibras de colágeno, fibras de elastina e também os vasos linfáticos e sanguíneos. A derme reticular fica abaixo da derme papilar, tem menos células e relativamente menos vasos sanguíneos, emaranhados de colágeno

denso e rígidas fibras de elastina. Essa é a região que mais suporta as tensões causadas por solicitações físicas na pele (PUGLIESE, 2001).

### 3.3 Pigmentação cutânea

O pigmento da pele se origina em uma célula chamada melanócito, cujo nome vem de *melas* que, em grego, quer dizer preto. Essas células encontram-se na camada basal da epiderme. Um melanócito produz melanina para cerca de 36 queratinócitos. A associação de um melanócito com esses queratinócitos é chamada de unidade de melanina epidérmica. A melanina produzida nos melanócitos é transferida para os queratinócitos em “pacotes”, chamados melanossomos. Os melanossomos são transferidos aos queratinócitos pelas projeções dendríticas dos melanócitos.

A coloração da pele é regulada principalmente pela quantidade e tipo de melanina sintetizada pelo melanócito epidérmico. Além desses fatores, existem outros, como a eficiência da transferência da melanina a partir do melanócito para as vizinhanças dos queratinócitos, bem como a distribuição e a degradação dos melanossomos transferidos pelos queratinócitos receptores. Uma vez sintetizado no corpo celular do melanócito epidérmico, melanossomos pigmentados são transferidos para os dendritos do melanócito. Os melanossomos situados periféricamente são transferidos aos queratinócitos e, uma vez incorporados a estes, são distribuídos individualmente ou em *clusters*, agregados em direção ao pólo apical do núcleo e então são degradados, conforme o queratinócito passa pela etapa final da diferenciação e descamação (BOISSY, 2003).

A pele humana possui tons de vermelho, amarelo, marrom ou azul. A cor vermelha deve-se ao pigmento do sangue chamado hemoglobina oxigenada e os pigmentos amarelos são chamados carotenóides. A cor azul deve-se à hemoglobina nas veias, que é chamada hemoglobina reduzida, e a cor marrom deve-se à presença de melanina (PUGLIESE, 2001).

A melanina é um biopolímero, uma molécula grande e complexa formada de pequenas unidades. Sua unidade básica é a tirosina, um aminoácido. Existem dois tipos

diferentes de melanina: eumelanina e feomelanina. A eumelanina é a melanina marrom ou preta, que é vista na pele marrom e no cabelo preto e tem uma forma de um grânulo oblongo ou esférico de, aproximadamente, 0,9  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3  $\mu\text{m}$  de largura. A feomelanina possui uma cor vermelha amarelada, tem a forma de um grânulo de aproximadamente 0,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Feomelanina é sintetizada a partir da tirosina e da cisteína. Essa combinação faz a feomelanina menos estável à radiação UV, que provoca sua fotooxidação. Os melanócitos possuem diferenças morfológicas e também diferenças em seus arranjos nas células, de acordo com as diferenças raciais. Nos caucasianos e mongóis, os melanossomos ocorrem em grupos, enquanto que em negróides e aborígenes australianos, ocorrem separados (PUGLIESE, 2001).

A produção de pigmento na pele é controlada por uma série de fatores internos e externos ao corpo. Tanto forças de inibição como forças de estimulação atuam constantemente. Existem dois componentes de pigmentação na pele que contribuem para a sua cor. A cor constitutiva da pele é a melanina básica geneticamente herdada sem nenhum efeito de radiação solar. A síntese da pigmentação constitutiva da pele pelo melanócito é primeiramente controlada pela família de proteínas gene tirosinase, que regulam o tipo de melanina sintetizada. Mutações que afetam essas proteínas melanogênicas resultam em várias formas de albinismo (BOISSY, 2003).

A cor facultativa da pele é aquela que se pode induzir, é o resultado da exposição solar e inclui o bronzeamento imediato e o bronzeamento tardio. Essa cor facultativa é reversível e diminui até o nível da cor constitutiva da pele (PUGLIESE, 2001).

Em função de características físicas e respostas da pele à irradiação solar, Fitzpatrick estruturou uma classificação dos tipos de pele em categorias (FITZPATRICK, 1976). Esta classificação considera desde indivíduos de pele extremamente sensíveis ao sol até aqueles com grande tolerância à radiação solar. Para esta classificação, atributos como o grau de pigmentação da pele, a cor dos cabelos e dos olhos e a sensibilidade da pele, são utilizados como parâmetros que permitem a subdivisão em seis diferentes fototipos, conforme mostra a tabela 2 (KEDE; SABATOWICH, 2004).

Tabela 2. Classificação dos fototipos de pele segundo Fitzpatrick (1976)

| <i>Fototipo</i> | <i>Cor dos Cabelos</i>  | <i>Cor da Iris</i>      | <i>Propensão a Queimadura (Eritema)</i> | <i>Propensão ao escurecimento (Pigmentação)</i> |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|---|---|
| I               | Louro                   | Azul                    | Sempre se queima facilmente             | Nunca se bronzeia                               |
| II              | Ruivo                   | Azul e verde            | Sempre se queima facilmente             | Bronzeia-se minimamente                         |
| III             | Castanho-claro          | Castanho-claro          | Queima moderadamente                    | Bronzeia-se gradualmente                        |
| IV              | Castanho-escuro         | Castanho-escuro         | Queima-se minimamente                   | Sempre se bronzeia bem                          |
| V               | Castanho-escuro / Negro | Castanho-escuro / Negro | Queima-se raramente                     | Bronzeia-se profundamente                       |
| VI              | Negro                   | Negro                   | Nunca se queima                         | Profundamente pigmentada                        |

Fonte: Kede e Sabatowich (2004) e FDA (1993)

Gravidez e pílulas anticoncepcionais produzem mudanças temporárias na pigmentação da pele. No caso de gravidez a mudança ocorrerá nos seios e na linha divisória do abdômen. No caso de ingestão de pílulas anticoncepcionais essa mudança ocorrerá na face. A doença de Addison que se caracteriza pela insuficiência da glândula adrenal tem um efeito similar no pigmento da pele, mas no caso da doença ocorre um aumento mais generalizado da pigmentação da mesma. Isso porque existe uma relação complexa entre hormônios, luz solar e fatores genéticos nos melanócitos que não é completamente compreendida (PUGLIESE, 2001).



#### 4. A LUZ E A PELE

Com exceção das células pigmentadas, as células vivas absorvem pouca luz visível. A radiação infravermelha penetra profundamente os tecidos do corpo humano. Na fotobiologia, é importante que se estude os efeitos das radiações: visível, UVA e UVB. Esses três tipos de radiação são os que mais interagem com a pele e, conseqüentemente, causam maior dano ao corpo.

A matéria sólida das células é constituída na sua maioria por proteínas e água que representa 70% ou mais da célula. As proteínas e a água são o primeiro alvo de parte da radiação UV entre 260 e 280nm, embora ocorra a absorção tanto abaixo quanto acima dessa faixa, neste intervalo há uma forte absorção. Quando a luz incide sobre a pele, ela pode ser absorvida, espalhada ou refletida. Somente a luz absorvida produz mudanças na molécula que a absorve. Esse ponto de absorção é chamado cromóforo. Cada cromóforo absorve luz numa determinada faixa de comprimento de onda e sofre alterações em conseqüência dessa absorção. A melanina é o principal cromóforo da pele e absorve desde 290 até 1200nm. As alterações sofridas pelos cromóforos são denominadas reações fotoquímicas. São as reações fotoquímicas que desencadeiam todas as outras reações bioquímicas que resultam em danos à pele. Boa parte dos efeitos fisiológicos das radiações é conseqüência das reações de caráter inflamatório e oxidante, desencadeadas pelas reações fotoquímicas. Alguns exemplos de cromóforos são: ácidos nucléicos, que formam o ácido desoxirribonucléico (DNA); aminoácidos, que formam as proteínas; e ácido urânico. Esses cromóforos absorvem fortemente comprimentos de onda da radiação UVB (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002). Outras moléculas também atuam como cromóforos – melanina, tirosina, queratina, triptofano, histidina, porfirinas, caroteno e hemoglobina (OKUNO; VILELA, 2005).

A interação da radiação UV com o DNA é a principal causa de problemas associados com danos causados à pele pelo sol, incluindo o câncer. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o câncer de pele não-melanoma representava em 2002, 18,4% dos casos de câncer da Brasil (CORRÊA; DUBUISSON; PLANA-FATTORI, 2003).

Como já mencionado, a radiação ultravioleta é a região do espectro eletromagnético emitido pelo Sol, compreendida entre os comprimentos de onda de 100 a 400nm e pode ser dividida em três faixas, levando-se em conta suas características de propagação e efeitos fisiológicos.

A radiação UVA compreende os comprimentos de onda entre 320 e 400nm. A radiação que possui comprimento de onda compreendido nesse intervalo atravessa a maior parte dos vidros comuns. Dependendo da espessura da pele, podem atingir tecidos dérmicos, o que a torna tão perigosa quanto a radiação de comprimentos de onda de maior energia (UVB). A faixa UVA pode ser subdividida em radiação UVA curto ou UVA II, de 320 a 340nm, responsável pela grande maioria dos efeitos fisiológicos causados pela radiação UVA na pele, e radiação UVA longo ou UVA I, de 340 a 400nm, responsável por alterações nas fibras elásticas e também é carcinogênica mesmo em doses sub-eritematosas. O UVA I é o componente do UVA capaz de causar a mutação no gene supressor de tumor p-53 (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002; OKUNO; VILELA, 2005).

A radiação UVB compreende os comprimentos de onda que vão de 290 a 320nm. A radiação que possui comprimento de onda nesse intervalo não atravessa os vidros comuns. Esse tipo de radiação possui pequena penetração na pele, mas devido à sua alta energia, são os maiores responsáveis pelos danos imediatos da radiação solar e por boa parte dos danos tardios. São responsáveis também pela transformação de ergosterol epidérmico em vitamina D.

A radiação UVC compreende os comprimentos de onda que vão de 100 a 290nm e é a radiação com maior poder carcinogênico (OKUNO; VILELA, 2005). Felizmente, a radiação que possui comprimento de onda compreendido nesse intervalo é absorvida pelas camadas superiores da atmosfera terrestre, rica em ozônio, e praticamente não chegam à superfície terrestre. Alguns estudos detectaram uma destruição lenta na camada de ozônio provocada pelos clorofluorocarbonetos (CFC), uma família de gases utilizados até há pouco tempo como propelente em aerossóis e em refrigeração (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

Os comprimentos de onda acima de 1000nm são em grande parte absorvidos pelo vapor de água e pelo gás carbônico da atmosfera. Os comprimentos de onda de 700

a 1500nm atravessam completamente a pele (dependendo da cor, da espessura e características individuais). A faixa de 1500-5000nm é barrada pela epiderme e derme. Os comprimentos de onda acima de 5000nm não atravessam a camada córnea.

Além de conhecer os níveis de energia dos vários intervalos da radiação solar, é importante conhecer a quantidade de energia total recebida durante a exposição ao sol. Essa quantidade é chamada dosagem e é calculada pelo produto da intensidade pelo tempo de exposição:

$$\text{Dosagem (Joules)} = \text{intensidade (W/m}^2\text{)} \times \text{tempo (s)} \quad (\text{Eq.4.1})$$

Existe também um parâmetro chamado Índice Ultravioleta (IUV) criado para definir a intensidade da radiação a que o paciente está exposto. Foram definidos 15 níveis de intensidade (sendo que o índice 15 corresponde ao pico do verão ao meio dia) (KIRCHHOFF, 1995).

Para a determinação do IUV, o espectro da radiação solar é ponderado pelo chamado espectro de ação eritematosa (ver figura 6), que fornece a sensibilidade relativa da pele (determinada pela indução de eritema) à radiação UV em função do comprimento de onda incidente (INPE, 2006).

O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), através do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC), monitora continuamente o IUV via satélite. Na tabela 3, são apresentados os valores de IUV agrupados em categorias, conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (INPE, 2006).

Tabela 3. Categorias do Índice Ultravioleta

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

Fonte: INPE (2006)

A tabela 4, apresentada por Kirchoff (1995), mostra a correspondência entre os índices UV de 0 a 15 e os intervalos de tempo em minutos para a exposição sem perigo de queima, desde o mais sensível ao menos sensível dos fototipos (KIRCHHOFF, 1995).

Tabela 4. Tempos máximos de exposição solar em função do índice UV

| <i>Índice UV</i> | <i>Tempo para se queimar (min)</i> |                    |
|------------------|------------------------------------|--------------------|
|                  | <i>Fototipo I</i>                  | <i>Fototipo VI</i> |
| 0-2              | 30                                 | >120               |
| 3                | 20                                 | 90                 |
| 4                | 15                                 | 75                 |
| 5                | 12                                 | 60                 |
| 6                | 10                                 | 50                 |
| 7                | 8,5                                | 40                 |
| 8                | 7,5                                | 35                 |
| 9                | 7                                  | 33                 |
| 10               | 6                                  | 30                 |
| 11               | 5,5                                | 27                 |
| 12               | 5                                  | 25                 |
| 13               | 4                                  | 23                 |
| 14               | 4                                  | 21                 |
| 15               | 3                                  | 20                 |

Fonte: Kirchoff (1995)

Esta informação pode também ser colocada na forma gráfica, como mostra a figura 5.

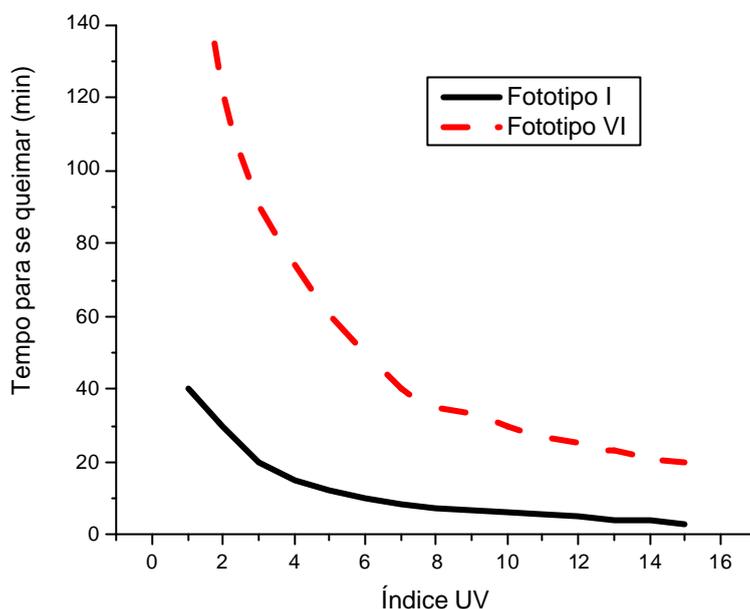


Figura 5. Tempos máximos de exposição solar em função do índice UV (KIRCHHOFF; 1995).

O fator que tem maior importância na determinação da intensidade da radiação UV terrestre é a altura do sol no céu ([DEFINIR ALTURA DO SOL, VER INTERNET](#)), que depende da hora do dia, da estação e da latitude. A altitude, a cobertura de nuvens, o terreno, a quantidade de céu limpo são fatores de menor importância.

A maior densidade de radiação UV é recebida nas quatro horas em torno do zênite solar (isto é, quando o sol está em seu ponto mais alto no céu), entre 11h e 15h em um dia claro de verão. Neste período, o ângulo dos raios solares relativamente à superfície da Terra é tal que a luz tem a menor distância para atravessar a atmosfera e, portanto, menor oportunidade de ser absorvida ou refletida. Como resultado, cerca de um terço da radiação UV diária é recebida entre 10h e 16h.

Os níveis de UVB, em particular, variam significativamente durante o dia, sendo muito mais suscetíveis aos fatores atmosféricos do que a UVA e a luz visível; assim, no verão, a intensidade de UVB aumenta e diminui muitas vezes entre 10h e 16h.

Variações sazonais na intensidade de radiação UV, particularmente de UVB, são mais pronunciadas em climas temperados como os do norte da Europa. Nessas regiões a intensidade de UVB pode variar até 25 vezes entre o inverno e o verão. A intensidade de UVA é mais constante sendo menos suscetível à reflexão, à deflexão e ao conseqüente enfraquecimento durante uma passagem mais curta ou mais longa pela atmosfera. Próximo ao Equador os níveis de UV variam muito menos, sendo altos durante o ano todo.

A radiação UV diminui à medida que se afasta do Equador. Por exemplo, a média de exposição anual para uma pessoa vivendo no Havaí (20°N) é aproximadamente quatro vezes maior do que a de uma outra vivendo no norte europeu (50°N) (HAWK; MCGREGOR, 2001).

De uma forma simplificada, quando a luz atinge a pele, parte dela é refletida e volta ao primeiro meio e outra parte penetra a pele em camadas mais profundas até que a energia incidente seja totalmente dissipada (OKUNO; VILELA, 2005). Por ser a camada mais externa da pele, o estrato córneo é responsável pela maior parte da luz do sol refletida, sendo que o nível de reflexão depende da condição do estrato córneo (PUGLIESE, 2001).

Ao atingir a pele humana, aproximadamente 4% da luz é refletida especularmente pela interface ar/estrato córneo, devido à mudança no índice de refração. A radiação que penetra na epiderme sofre um pequeno espalhamento, sendo absorvida principalmente pela melanina presente. A radiação remanescente atravessa a camada basal atingindo a derme, onde é fortemente espalhada pelas fibras de colágeno e absorvida pela hemoglobina, tanto por capilares como por veias e artérias superficiais. Da intensidade total incidente, entre 30 a 60% é espalhada de volta para a superfície da pele e é novamente atenuada pelos cromóforos que encontra (hemoglobina, melanina) e espalhada pelas fibras de colágeno. A luz “refletida” pela pele é constituída de duas componentes: uma delas, especular (4%), possui a mesma composição espectral da luz incidente; a outra é a componente da luz incidente modificada pelas substâncias da pele que absorvem ou espalham essa luz. As substâncias que espalham a luz, dependendo de suas dimensões moleculares quando comparadas ao comprimento de onda da radiação

incidente, podem produzir modificações específicas em relação aos comprimentos de onda. O espalhamento é sempre mais forte no azul que no vermelho (KOLLIAS *et al.*, 1991).

Os raios de luz mudam de direção quando encontrarem diferentes meios a serem atravessados. A luz é espalhada pelos vários componentes da pele, como: células, moléculas e fibras. Os raios de luz sofrem refração e penetram na pele em ângulos diferentes daqueles que atingiram o estrato córneo. Ao penetrar na epiderme, a luz é absorvida e/ou espalhada pelos vários componentes da célula, como proteínas, DNA, RNA, melanina e aminoácidos (PUGLIESE, 2001).

A radiação UV de comprimentos de onda inferiores a 320nm é absorvida principalmente pelo estrato córneo e a epiderme, enquanto radiações UV de comprimentos de onda maiores atingem a derme. Entretanto, não devemos pensar em valores exatos de comprimento de onda que são absorvidos em cada camada da pele. Trata-se de um sistema complexo e com muitas variáveis. De um ponto de vista prático, a pele úmida e brilhante absorve mais que a pele seca e opaca, seu índice de refração é mais próximo ao do ar o que faz com que ocorra menor espalhamento e, conseqüentemente, maior penetração. O uso de óleo mineral sobre a pele antes de um banho de sol, aumenta a quantidade de radiação absorvida pela pele sem nenhum benefício de proteção. A utilização deste tipo de produto contribui com o aumento dos efeitos deletérios da radiação UV (PUGLIESE, 2001).

#### **4.1 Luz solar e pigmentação da pele humana**

O sistema de pigmentação dos seres humanos deriva dos africanos, que migraram para a Ásia e Austrália, aproximadamente, 60.000 anos atrás. Através de várias gerações, eles se adaptaram progressivamente à radiação solar local. Gradualmente, seu sistema de pigmentação foi divergindo em subtipos geneticamente diferentes. Os subtipos, negróide, mongólico e caucasiano são os mais comuns na África, Ásia e Eurásia, respectivamente.

Há, aproximadamente, 10.000 anos, grupos da Ásia migraram para as Américas. É interessante notar que 10.000 anos não foram suficientes para que houvesse a criação

de um novo subtipo, porque os americanos nativos ainda têm relação genética com o subtipo mongólico. Como em outras partes do mundo os americanos nativos adaptaram sua produção de melanina à exposição solar local. A produção de melanina e a cor da pele estão relacionadas com a disposição genética e com a radiação solar local (CIBA, 2004).

Como mencionado anteriormente, a melanina absorve tanto a luz visível como a luz ultravioleta. Trata-se de uma substância natural responsável pela pigmentação da pele, representando a primeira defesa físico-química contra os danos da radiação solar (OKUNO; VILELA, 2005).

Quanto mais melanina a pele possui, mais luz é absorvida e mais escura será a aparência da pele. No caso de negróides ou negros que possuem muita melanina na pele, a grande absorção de luz pela melanina permite que pouca luz seja refletida pela pele. Esta capacidade de absorção de luz pela melanina confere à pele negra alta proteção contra a luz ultravioleta.

Os melanócitos respondem à luz solar com um aumento nos melanossomos, um aumento nos melanócitos e um rearranjo dos melanossomos. Isso é essencialmente um mecanismo de proteção e um dos principais propósitos da produção de melanina. Entre os queratinócitos da epiderme, os melanossomos formam uma estrutura com a forma de um chapéu sobre os núcleos das células vivas. Esse é, obviamente, um arranjo protetor para prevenir danos ao núcleo da célula, causados pelos raios UV. Alguns pesquisadores reportaram que a pigmentação constitutiva é muito superior na proteção à radiação UV quando comparada à pigmentação facultativa.

Após a exposição solar, existe um efeito imediato nos grânulos de melanina que ocorre dentro de poucos minutos. Esse efeito é a foto-oxidação da melanina e pode ser um sinal do tipo “gatilho”. Dentro de duas horas, os melanossomos se deslocam para as ramificações dos melanócitos, e então, são transferidos para os queratinócitos. Dois ou três dias mais tarde, o efeito tardio se manifesta pelo aumento de melanogênese e um aumento nos melanócitos e queratinócitos. A pele se torna mais escura como resultado dessa atividade, chamada bronzeamento (PUGLIESE, 2001).

O bronzeamento pode ser dividido em imediato ou tardio. O bronzeamento imediato aparece imediatamente, mas pode desaparecer dentro de um período que pode variar desde minutos até 24 horas após a exposição. O bronzeamento tardio é um tipo de pigmentação facultativa que ocorre quando a exposição ao sol é repetida. Ele pode ocorrer tanto com a exposição à radiação UVA (320-400nm) como com a exposição à radiação UVB (290-320nm) e aparecerá normalmente entre 26 e 48 horas depois da exposição e pode permanecer por um período que varia de algumas semanas até meses.

Um aumento no número de melanócitos alojados na camada basal tem sido reportado tanto para bronzeamentos induzidos por UVA como por UVB, mas somente com exposições repetidas. Uma única dose de exposição ao ultravioleta irá, apenas, aumentar a atividade dos melanócitos. As múltiplas exposições irão aumentar tanto o número de unidades de melanina epidérmica como o número de melanossomos. Mas é importante ressaltar que, de qualquer forma, a luz ultravioleta também induz a inflamação da pele. Os ácidos nucléicos e as proteínas sofrem danos e os radicais livres são formados em grande quantidade, membranas celulares são prejudicadas e ocorre uma reação inflamatória generalizada (PUGLIESE, 2001).

## **4.2 Melanina e inflamação da pele**

Um dos primeiros sinais visíveis dos danos da radiação solar na pele é o eritema. O eritema resulta da dilatação dos vasos sanguíneos na derme como uma resposta aos subprodutos do dano celular. Dependendo do comprimento de onda da luz, o eritema aparece de duas a seis horas após a radiação com um pico entre 12 a 20 horas mais tarde. É possível que o eritema permaneça por um período que pode durar algumas horas ou alguns dias, esse período é uma função da energia total recebida na exposição.

A intensidade ou grau do eritema é uma boa indicação da severidade do dano infligido à pele pelo sol. Essa vermelhidão é usada como medida da eficácia dos protetores solares. A mínima dose eritematosa (MDE) é estabelecida para cada indivíduo usado em um painel de testes para protetores solares, quando FPS é determinado. Vale lembrar ainda que, como apresentado anteriormente na tabela 2,

existem seis tipos diferentes de pele e esta é atualmente classificada pela: quantidade de pigmentação, facilidade para ser queimada e resistência ao bronzeamento.

O eritema é a alteração fisiológica mais comum provocada pela exposição ao sol. Na realidade, é o resultado de uma inflamação da pele que por ser facilmente induzida, serve de modelo para o estudo do mecanismo de inflamação nos sistemas biológicos.

O eritema é proporcional à quantidade de radiação que incide sobre a pele. Se o eritema é muito intenso, será considerado como uma queimadura solar. Por outro lado existe uma quantidade mínima de radiação, abaixo da qual o eritema não é percebido clinicamente. A MDE depende do tipo de pele do indivíduo, da quantidade de melanina na pele, do comprimento de onda e da intensidade da radiação incidente (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

O comprimento de onda mais efetivo para a produção do eritema é o de 297nm. Para a exposição à radiação UVA em 365nm é necessário 1800 vezes mais energia para produzir eritema do que em 297nm.

Entre 8 e 24 horas após a irradiação, as células danificadas, denominadas células “com queimaduras de sol”, aparecem na epiderme. Como e por que essas células aparecem é um fato desconhecido, mas essas células têm uma aparência característica que é sintomática de dano induzido pelo sol: são encolhidas com um núcleo condensado e o citoplasma avermelhado. Dentro da célula, filamentos emaranhados, grânulos de melanina e lisossomos intactos podem ser vistos. Não é muito conhecido por que somente certas células exibem o fenômeno da “queimadura solar”. Sabe-se apenas que essas células parecem ter sofrido um dano nuclear mais forte, provavelmente por causa do aumento da síntese de DNA durante o tempo de exposição.

Depois da irradiação, as células diminuem a produção de DNA por até 12 horas, e em seguida, esta produção volta a atingir níveis normais depois de 24 horas. Esse fenômeno é seguido por uma taxa, da ordem de seis ou sete vezes mais rápida, de síntese de DNA até 48 horas após a exposição. A partir deste ponto, a taxa de mitose aumenta e se mantém elevada por até quatro semanas.

As infecções e danos que são frequentemente associados com a hiperpigmentação da pele são conhecidos há muito tempo. Em pessoas de fototipo caucasiano essa infecção causa uma protuberância vermelha, depois uma pústula e finalmente volta a ser uma protuberância ou apenas uma mancha marrom amarelada. A vermelhidão ocorre devido a dilatações capilares e um real aumento do número de capilares em torno da região inflamada. A cor marrom ocorre como resultado do aumento da atividade dos melanócitos que gera uma maior produção de melanina. Em pessoas de fototipo negróide esse fenômeno é mais acentuado, resultando em pontos mais profundamente pigmentados. O aumento da atividade dos melanócitos resulta de um aumento da estimulação dos mediadores inflamatórios. Quando a inflamação diminui, os mediadores inflamatórios voltam a níveis normais e também a produção de pigmentação. No processo, as células hiper pigmentadas atingirão o estrato córneo e gradualmente serão descamadas; a hiper pigmentação desaparecerá.

As primeiras mudanças causadas pela radiação UVA e UVB são alterações bioquímicas do DNA, desordem da membrana celular, efeitos em enzimas e outras proteínas e aminoácidos. A quebra e reparo do DNA são processos relativamente rápidos, sendo completados em um dia quando a dosagem de radiação é baixa; porém com altas doses de radiação estes processos pode sofrer uma inibição.

Em resposta à agressão, produtos de células danificadas são liberados e podem causar efeitos imediatos e de longo prazo. Esses compostos fazem parte da resposta inflamatória da pele e são muitas vezes têm papel importante no mecanismo de reparo do tecido. Essa resposta está associada à liberação de enzimas como produtos de decomposição química celular. Essas mudanças podem ser vistas em microscópio e ocorrem entre horas e dias após a irradiação.

A radiação UV e, especificamente, a radiação UVB induz o eritema, que pode ser seguido de pigmentação e espessamento da espessura da epiderme. Os eventos cutâneos induzidos pela exposição à radiação UV são conseqüências diretas da absorção de fótons pelo DNA celular, e pelo estresse oxidativo induzido por várias reações indiretas ligadas a absorção de radiação UV pelos cromóforos celulares. O estresse oxidativo se deve à produção de radicais livres e espécies de oxigênio reativo, que levam à lipoperoxidação de membranas e também a produtos de fotooxidação dentro do

DNA. Lesões diretas e indiretas do DNA devem ser reparadas antes da divisão celular, com o objetivo de reduzir ou abolir mutações (CÉSARINI, 2003).

#### **4.2.1 Células com queimaduras de sol e o gene p53**

O corpo possui um mecanismo para destruir as células que são alteradas pelos raios UV se as mesmas não forem reparadas. O gene responsável por essa ação é o p53. O método de destruição é a apoptose, a destruição sistemática do núcleo e do citoesqueleto da célula. Sabe-se que a exposição moderada aos raios UV pode danificar o DNA e o gene p53 de tal forma a bloquear o mecanismo natural de destruição das células danificadas. A radiação UVA pode causar a mutação no gene p53, que então não conseguirá mais controlar o ciclo celular e a apoptose. Sem a proteção do gene p53, essas células podem continuar a crescer e, eventualmente, podem se tornar malignas. Essa é uma das principais razões que fazem com que áreas muito expostas ao sol desenvolvam câncer (OKUNO; VILELA, 2005).

#### **4.3 O efeito do sol na pele em médio e longo prazo**

O sol é a fonte de energia para toda a vida no planeta. A radiação solar gera bem estar, ilumina, aquece, participa dos processos de fotossíntese nas plantas e síntese de vitamina D nos seres humanos. Seu poder cicatrizante é conhecido desde tempos remotos. A luz solar é amplamente utilizada inclusive na medicina, mas isto não significa que se um pouco de luz solar é bom para o corpo, mais radiação será ainda melhor. A radiação solar em excesso causa danos irreversíveis à pele. Entre eles o envelhecimento precoce e câncer (OKUNO; VILELA, 2005; PUGLIESE, 2001).

Nos Estados Unidos, uma entre seis ou sete pessoas desenvolvem algum tipo de câncer de pele (The Merck Manual *apud* WATCHTOWER, 2005). Mas a taxa está, ainda, aumentando. Estima-se que 50% das pessoas que atingirem a idade de 65 anos de idade desenvolverão alguma forma de câncer (LANE *apud* WATCHTOWER, 2005).

De acordo com a Academia Americana de Dermatologia, o melanoma maligno é causa de cerca de 7.500 mortes por ano só nos Estados Unidos (WATCHTOWER, 2005).

Os três tipos mais comuns de câncer de pele são: carcinoma de célula basal, carcinoma de célula escamosa e o melanoma maligno. Os dois carcinomas começam na camada mais externa da pele, cuja espessura média é de apenas 1/25 de uma polegada. Esses cânceres que não são melanomas malignos parecem resultar da exposição crônica ao sol, como no caso de pessoas que trabalham expostas à luz solar; aparecem, quase que exclusivamente, nas regiões que ficam mais expostas como face e mãos. Melanomas malignos, que correspondem a apenas 5% de todos os tipos de câncer de pele, também começam na camada mais externa da pele. Um dos principais fatores que levam ao aparecimento do melanoma parece ser a exposição intensa e intermitente à luz solar, como aquela recebida por pessoas que não trabalham expostas ao sol, mas passam as férias recebendo a radiação. Esse tipo de câncer é mais mortal se não for tratado no começo, pois pode invadir a camada mais interna da pele, a derme, onde os vasos sanguíneos e o sistema linfático estão localizados. Depois disso, esse câncer pode facilmente atingir a etapa de metástase. O paradoxo do melanoma é que ele é uma doença altamente curável quando tratada no começo. Por outro lado, quando já metastático é relativamente resistente ao tratamento com drogas ou radiação (NATHANSON *apud* WATCHTOWER, 2005). De fato, apenas 2 ou 3% dos pacientes com melanoma secundário sobrevivem por cinco anos (WATCHTOWER, 2005).

Está claramente estabelecido que os comprimentos de onda da radiação UV do sol são carcinogênicos, contribuindo para a formação de cânceres do tipo carcinoma e melanoma das células basais e escamosas. Há um consenso geral de que os carcinomas de células basais e escamosas são, predominantemente, um resultado do dano direto do DNA pela interação com a radiação UVB (LINGE, 1996 *apud* HAYWOOD *et al.*, 2003). Dados epidemiológicos ligam o melanoma à intensa exposição de radiação solar na infância e promove suporte para um papel da radiação UVA (MOAN *et al.*, 1999 *apud* HAYWOOD *et al.*, 2003). Embora haja um consenso de que a radiação UV seja a causa, os comprimentos de onda precisos e os mecanismos envolvidos não estão claros. Setlow *et al.* (*apud* HAYWOOD *et al.*, 2003), mostraram a indução de melanoma no peixe *Xiphophorus* por meio de radiação de comprimentos de onda de UVA, UVB e

azul; demonstrou-se que existe igual efetividade de indução por meio de radiação UVA e UVB de hiperplasia de melanócitos no roedor *Monodelphis domestica*; e Noonan *et al.* (apud HAYWOOD *et al.*, 2003), usando comprimentos de onda combinados de UVB e UVA, na razão de 2:1, recentemente demonstraram a indução do melanoma em rato neonatal transgênicos. Berking *et al.* (apud HAYWOOD *et al.*, 2003) mostraram que a radiação UVB em combinação com fator de crescimento de fibroblasto básico poderia transformar melanócitos humanos.

O conhecimento do papel da radiação UVA no melanoma humano ainda não é conclusivo (WANG *et al.*, 2001 apud HAYWOOD, 2003). Enquanto acredita-se que a radiação UVB interage diretamente com o DNA para iniciar mutações nas células basais e escamosas, acredita-se que comprimentos de onda de radiação UVA entre 320 e 400nm interagem indiretamente, induzindo a produção de radicais livres. Radicais livres podem danificar indiretamente o DNA e causar danos em proteínas, o que contribui para o envelhecimento precoce. Danos induzidos pela radiação UVA como produção do gene p53, danos ao DNA, instabilidade genômica e imunossupressão têm sido demonstrados (HAYWOOD *et al.*, 2003).

A radiação UV de 245 a 290nm é absorvida principalmente pelo DNA. A radiação UV é capaz de induzir fotoprodutos ou lesões no DNA cercado por pirimidinas adjacentes que se apresentam na forma de dímeros. Estes dímeros podem ser de ciclobutanos (CPDs) de resíduos de timina ou citosina adjacentes, e fotoprodutos de pirimidina entre resíduos adjacentes de pirimidina. Ambas lesões ocorrem mais freqüentemente em áreas em que se encontram resíduos de pirimidinas agregados, que são conhecidos como “pontos quentes” de mutações induzidas por radiação UV (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

O envelhecimento da pele é função de fatores cronológicos, danos de origem actínia e influências hormonais. A maioria das mudanças relacionadas ao envelhecimento como rugas e sardas, se devem ao fotoenvelhecimento e são um reflexo da exposição solar cumulativa (BOLOGNIA, 1995). Esse processo de envelhecimento precoce devido à exposição à radiação solar é cumulativo e afeta preferencialmente indivíduos que possuem pele mais clara. Durante os últimos 10 anos, progressos substanciais têm sido feitos para o entendimento dos mecanismos moleculares

responsáveis pelo fotoenvelhecimento da pele humana. Um deles é que a radiação UV provoca uma complexa seqüência de respostas moleculares específicas que danificam os tecidos conectivos da pele. Esse processo molecular deriva da habilidade da radiação UV explorar o mecanismo celular que regula as respostas das células em estímulos fisiológicos e ambientais. O mecanismo celular que media os danos causados pela radiação UV aos tecidos conectivos da pele, inclui receptores celulares superficiais, sinais de caminhos de transdução de proteína quinase, fatores de transcrição, e enzimas que sintetizam e degradam proteínas estruturais na derme, que conferem força e resiliência à pele (FISHER *et al.*, 2002).

No mínimo 90% dos problemas cosméticos associados com envelhecimento, conhecidos como fotoenvelhecimento da pele, são devidos à exposição excessiva ao sol. Essas mudanças são o enrugamento da pele; descoloração e a presença de múltiplos pontos pigmentados; atrofia ou pele fina; uma rede de vasos dilatados ou veias; e hipopigmentação ou ausência de cor. Fotoenvelhecimento também pode ser chamado de dano actínico (a palavra vem do grego *aktis*, que significa raio), um termo freqüentemente usado na literatura médica.

Quando a pele é examinada microscopicamente, apenas a minoria das mudanças na epiderme, que se manifestam por uma junção mais achatada da derme com a epiderme e um afinamento da camada espinhosa, é observada. Na derme, há mudanças mais pronunciadas. A derme papilar é fina e homogênea, vasos sanguíneos ficam dilatados e existem áreas fibrosas amorfas e fragmentadas, chamadas elastoses solares, presentes por toda a extensão da derme. Esses efeitos estão relacionados tanto com a severidade como com a freqüência de exposição (PUGLIESE, 2001).

#### **4.3.1 Efeitos Imunológicos**

Enquanto alguns dos efeitos do sol no sistema imunológico estão apenas começando a ser conhecidos, sabe-se que há um efeito sobre a célula de Langerhans. Estas células são dendríticas e provenientes da medula óssea, com função macrofágica-monocítica e atuam, entre outros, nos processos de hipersensibilidade, na proteção às

infecções virais e na eliminação de células epidérmicas em proliferação. Seu número é reduzido pela ação da radiação UV. A atividade imunológica da pele é de suma importância e a radiação UV, ao reduzir o número de células de Langerhans, diminui a função imunológica cutânea (OKUNO; VILELA, 2005). Essas células especiais, após serem irradiadas, perdem certos marcadores de membrana que são essenciais para os processos de informação. É possível que a habilidade de reparar e detectar mudanças anormais na epiderme seja alterada ou perdida pelas células de Langerhans. Tumores da pele ou outras condições adversas podem ser geradas como resultado dessa alteração. A reação de hiper sensibilidade tardia em idosos acontece e certas reações de sensibilidade a alergênicos conhecidos, também são reduzidas ou eliminadas.

Muitos dos danos do fotoenvelhecimento podem ser reversíveis se a exposição contínua ao sol for interrompida. Sabe-se que o corpo pode reparar os danos no DNA. O oxigênio singlete pode ser inativado e, conseqüentemente, os radicais livres não seriam gerados. O colágeno e a elastina podem ser reparados e uma nova circulação restabelecida. O uso da vitamina E, beta-caroteno e vitamina A ajudam na prevenção de danos e em certa medida, no restabelecimento da pele (PUGLIESE, 2001).

#### **4.4 Proteção solar**

No início do século 20 as pessoas iam mais protegidas à praia. No seu dia-a-dia, usavam vestidos longos, chapéus, guarda-sóis, tendo mínima exposição ao sol, pois os costumes rígidos da época não permitiam a exposição do corpo. Na década de 30, o bronzamento já se tornou um assunto de interesse e a liberação dos costumes permitiu maior exposição do corpo.

Nos anos 50, já se falava em bronzamento rápido e lento. Do meio para o final do século 20 houve uma grande liberalização dos costumes, maior exposição ao sol e, conseqüentemente, maior valorização do corpo. Com isso, a preocupação com a saúde e os cuidados com a proteção solar ganharam destaque.

A exposição ao sol tornou-se um assunto de saúde. A linha de comunicação adotada pelos órgãos de saúde, associações médicas e por empresas foi se alterando e o

assunto começou a ser tratado com maior seriedade. O câncer de pele passou a ser tema de artigos e o sol passou a ser percebido como uma condição de perigo. Assim, o uso diário de protetores solares por recomendação médica, transformou esses produtos em artigos de consumo. A população passou a ter acesso à informação e, dessa maneira, passou a se preocupar mais com o assunto.

Hoje, além de se evitar a formação de eritemas, parte da população já relaciona o envelhecimento aos efeitos do sol, a proteção solar foi assim incorporada ao cotidiano de algumas pessoas. Hoje já se sabe que 80% dos danos causados pelo sol ocorrem antes dos 18 anos e que o efeito do sol é cumulativo (CIBA, 2004).

O interesse do consumidor na proteção solar contra a radiação UV é muito grande e está crescendo, principalmente por causa do câncer de pele. Mais de 1 milhão de americanos serão diagnosticados como portadores de câncer de pele só neste ano, metade dos quais serão cânceres novos. Cerca de 1 em 5 americanos que vivem hoje, desenvolverá câncer de pele em algum momento de sua vida. Cerca de 1 em 87 americanos desenvolverá melanoma, o tipo mais perigoso de câncer. Quase todos os tipos de cânceres de pele e a maioria dos melanomas podem ser prevenidos pela minimização da exposição à radiação solar, particularmente, nos primeiros anos de vida, do nascimento até a idade de 20 anos. Evitar o sol, principalmente no meio do dia, fazer uso de roupas protetoras, chapéus e protetores solares de alto FPS são as bases para a prevenção de todas as formas de cânceres de pele (BERGER, 2006).

Apesar do uso extensivo de protetores solares durante as duas últimas décadas, a incidência de câncer de pele ainda está aumentando e o papel dos protetores solares na prevenção dos cânceres de pele é controverso. Tem se demonstrado que o uso de protetores solares diminui a formação de queratoses actínicas, relacionadas aos carcinomas das células escamosas (THOMPSON *et al.*, 1993; NAYLOR *et al.*, 1995 *apud* HAYWOOD, 2003). Experimentos com animais demonstram que os protetores solares diminuem a incidência de tumores das células basais e escamosas (SEKURA; SNYDER; MAY, 1975; KLIGMAN *et al.*, 1980; FORBES *et al.*, 1989; REVÊ *et al.*, 1990 *apud* HAYWOOD, 2003), os quais são relacionados com UVB. No entanto, existem muitos estudos que sugerem que o uso de protetores solares está associado com o aumento do risco de melanoma (AUTIER *et al.*, 1995; AZIZI *et al.*, 2000; VAINIO;

BIANCHINI, 2000 *apud* HAYWOOD, 2003). Isso pode refletir a aplicação inapropriada de protetor solar (STOKES; DIFFEY, 1997; Wulf *et al.*, 1997; GAUHAM; PADILLA, 1998 *apud* HAYWOOD, 2003), ausência de durabilidade da aplicação, a ausência ou inadequação de filtros UVA nas preparações de protetores solares, combinados com banhos de sol prolongados (AUTIER *et al.*, 1995 *apud* HAYWOOD, 2003); ou a fotoinstabilidade dos filtros solares dos protetores solares que resultam na redução da proteção, ou na produção de radicais livres (FLINDT-HANSE *et al.*, 1988; SHAW *et al.*, 1992; GASPARRO, 1993; KNOWLAND *et al.*, 1993; DUNFORD *et al.*, 1997 *apud* HAYWOOD, 2003). A relação entre o uso de protetores solares e melanoma ainda é, entretanto, debatida (HUNCHAREK; KUPELNIK, 2002; RIGEL, 2002 *apud* HAYWOOD, 2003) e não esclarecida (BIGBY, 1999 *apud* HAYWOOD, 2003).

As advertências por parte dos médicos de que a luz solar e os banhos de sol podem ser perigosos são relativamente recentes. Apenas nos últimos 20 anos é que os profissionais da área da saúde começaram a tentar desencorajar as pessoas a expor seus corpos em demasia à luz solar (HAWK; MCGREGOR, 2001).

As primeiras loções de bronzeamento solar eram frequentemente simples hidratantes, em alguns casos, com pequenas quantidades de filtros absorvedores de radiação UV. Produtos de proteção solar com filtros continham primeiramente filtros UVB em bases relativamente simples com substantividade limitada, sem uniformidade adequada para uma proteção eficaz do produto ao consumidor (COLE, 2001).

Os protetores solares são cremes de pele, loções ou aerossóis destinados a diminuir os riscos de queimaduras solares reduzindo a quantidade de radiação UV que atinge a pele; se usados adequadamente, diminuem os riscos de fotoenvelhecimento e de câncer de pele. Bloqueadores solares são igualmente usados nesse contexto, mas se referem a protetores mais poderosos; os bloqueadores são protetores que contêm óxido de zinco e titânio, os quais agem através da reflexão da luz solar. Todos os produtos de alta proteção são relativamente eficientes se forem aplicados cuidadosamente antes da exposição ao sol, se forem reaplicados a cada hora e se se entender que mesmo que forem utilizados, a exposição ao sol deve ser minimizada.

Existem, essencialmente, três tipos de protetores solares: os que contêm substâncias orgânicas que absorvem a radiação UV; os que contêm partículas extremamente finas que refletem essa radiação; e uma combinação dos dois. A maioria é uma combinação e oferece proteção tanto contra a UVB quanto contra a UVA, embora em menor grau para esta última. Atualmente há concordância geral de que a proteção dupla é preferível, embora a eficácia contra a radiação UVB seja a mais importante (HAWK; MCGREGOR, 2001).

Como no caso de protetores solares, o uso de produtos com filtros de larga absorção UVA e UVB é muito importante, mesmo em dias nublados, pois mesmo nesses dias 85% da radiação de raios UV penetram as nuvens. O protetor solar de FPS 15, no mínimo, é recomendado por especialistas (WATCHTOWER, 2005).

O fator de proteção solar ou FPS tem a finalidade de indicar ao consumidor qual o grau de proteção dado pelo produto. A grande variabilidade da radiação solar e os diferentes tipos de pele obrigam o consumidor a conhecer a própria pele para definir qual o FPS mais adequado ao seu uso.

Os métodos de medidas de FPS se baseiam no aparecimento de eritema na pele. Torna-se necessário, então, padronizar a forma de se medir esse eritema. Com o objetivo de se estabelecer um parâmetro de medida do eritema, a mínima dose eritematosa (MDE) é definida como a quantidade de energia requerida para produzir o primeiro eritema perceptível com bordas claramente definidas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UV.

O FPS corresponde a quantas MDE uma pessoa pode ficar exposta ao sol sem desenvolver o eritema. Assim, o FPS é definido como a relação entre a quantidade de energia (na região UV) requerida para produzir uma dose eritemática na pele protegida em relação à energia requerida para produzir uma dose eritemática na pele não protegida.

A relação matemática é expressa por:

$$FPS = \frac{MDE(pele\_protegida)}{MDE(pele\_n\~{a}o\_protegida)} \quad (\text{Eq.4.2})$$

Exemplificando: se uma pessoa pode ficar exposta ao sol por 10 minutos sem nenhum produto na pele sem desenvolver eritema, com um protetor de FPS 15 esse tempo pode ser prolongado para 15 vezes, isto é, 150 minutos (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).

O protetor solar deve ser usado para prevenir queimaduras de sol e outras formas de danos à pele causados por radiação UV. De acordo com Urbach a razão de danos dos componentes da radiação UVA e UVB na luz do sol durante um dia é de 80% UVB e 20% UVA. Dos 20% devido à radiação UVA, 62% do risco de danos têm sido atribuído ao UVA curto (320-340nm). Diffey e Cole têm descrito uma relação similar de UVB para UVA (4B:1A) para efeitos biológicos induzidos por radiação UV na pele. Portanto, para que se tenha proteção tanto contra a radiação UVA quanto contra a radiação UVB, um protetor solar deve proteger contra a razão 80/20 da radiação de UVB e UVA, respectivamente, da luz solar incidente (CTFA TASK FORCE, 2000).

Em situações experimentais, tem sido observado que o uso de protetores retarda o início da fotocarcinogênese, inibe a mutação do gene p53 nos queratinócitos e a incidência de queratose actínica em seres humanos. Entretanto, em relação ao melanoma, muitos estudos epidemiológicos têm encontrado um aumento do risco de melanoma associado ao uso de protetores solares (WESTERDAHL *et al.*, 2000).

Bloqueadores solares devem ser usados quando se desejar uma maior proteção. Esses agentes espalham e refletem efetivamente a radiação solar, prevenindo a penetração e absorção da luz. Possíveis ingredientes presentes nos bloqueadores solares são: o talco, o caulim, a argila, o amido, o óxido de zinco, o dióxido de titânio e o cloreto férrico. Esses componentes têm uso limitado, pois não são muito aceitáveis cosmeticamente.

Ainda não estão disponíveis agentes orais aprovados para a proteção solar. Duas substâncias, o beta-caroteno e a aspirina, foram testadas e mostram-se efetivas contra os efeitos deletérios da radiação solar; no entanto, não devem ser usadas sem o uso concomitante do protetor solar tópico (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002).



## 5. TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DA FOTOPROTEÇÃO

### 5.1 Metodologias *in vivo*

O FPS determinado *in vivo* é um indicador universal da eficácia de um protetor contra queimadura solar. O eritema induzido por UV a partir de um simulador solar é utilizado como parâmetro de medida (FDA, 1978; DIN, 1984; JCIA, 1991; FDA, 1993; COLIPA, 1994; COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003).

Historicamente, os primeiros estudos conhecidos que estabeleceram as bases para o FPS ou Índice de Proteção (IP) iniciaram-se na década de 1930, sendo publicados na década de 1940 por H. Blum e colegas e na década de 1950 por R. Schulze (COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003). Estes e outros trabalhos de grupos científicos e de padronização levaram à definição histórica do conceito de mínima dose eritematosa (MDE) e FPS e ao primeiro método padrão para a determinação do FPS e rotulagem, o qual foi publicado pelo FDA nos EUA em 1978 (“Monografia Tentativa”, FDA, 1978). Esta foi seguida em 1984 pela norma alemã DIN67501 (DIN, 1984), a qual foi aplicada principalmente na Europa. Esses dois padrões diferiam principalmente em relação ao tipo de fonte UV utilizados (respectivamente, lâmpada de arco xenônio ou luz natural e lâmpada de mercúrio) e as concentrações de produto aplicadas na pele (respectivamente, 2,0 e 1,5mg/cm<sup>2</sup>), o que causava algumas discrepâncias nos valores de FPS medidos.

Todas as normas publicadas posteriormente mantiveram a fonte artificial de arco xenônio e a concentração de aplicação de 2,0mg/cm<sup>2</sup>. Normas similares à do FDA foram então publicadas pela *Standard Association of Australia* (AAS) em 1983, a qual incluía testes de FPS e resistência à água, e pela *Japan Cosmetic Industry Association* (JCIA) em 1991 (JCIA, 1991). O *South African Bureau of Standards* (SABS) apresentou um método similar em 1992, o qual foi revisado em 2002. Uma nova versão da norma FDA (Monografia Final Tentativa) foi publicada em 1993. A implementação da versão 1999 (FDA, 1999) foi prorrogada para 2005 na expectativa de que métodos específicos para o teste e rotulagem quanto à proteção UVA seria introduzido, o que na

realidade, ainda não ocorreu. O *New Zealand Standard* juntou-se ao *Australian Standard* para a publicação de uma nova versão de sua norma (AS/NZS 2604:1993) em 1993 e sua versão revisada em 1998 (COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003).

A *European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association* (COLIPA), em seu método de teste de FPS de 1994, introduziu novas técnicas para caracterizar e especificar o espectro de emissão da fonte de UV e para colorimetricamente selecionar os tipos de pele. Ao mesmo tempo, dois produtos padrões de alto FPS foram propostos para levarem em consideração o aumento nos valores de FPS praticados no mercado. A *Austrian Onorm*, em 1948, e a nova norma DIN, de 1999, estavam em acordo com o método COLIPA 1994 (COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003).

Mais recentemente, a Coréia e o Mercosul (2002) adotaram referência aos padrões FDA ou COLIPA. A China também está em processo de adoção de uma norma para FPS (COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003).

No ano 2000, a COLIPA, a JCIA e a *Cosmetic, Toiletries and Fragrance Association of South Africa* (CTFA-SA) começaram a discussão sobre harmonização dos métodos de medidas de FPS. Em outubro de 2002, finalmente, um acordo sobre um método de teste de FPS internacional foi alcançado (COLIPA/JCIA/CTFA-AS, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução RDC nº 237, de 22 de Agosto de 2002, estabelece as normas para teste de FPS e rotulagem de produtos protetores solares. A ANVISA adotou, como procedimentos válidos para medida de FPS no Brasil, as normas FDA1993 ou COLIPA1994 (ANVISA, 2002).

Uma breve apresentação das metodologias adotadas na resolução ANVISA RDC 237 e da monografia Internacional COLIPA/JCIA/CTFA-SA de 2003 é apresentada a seguir.

### **5.1.1 Método FDA-1993 para a determinação do FPS e da resistência à água de protetores solares**

A monografia FDA-1993 foi emitida como uma proposta na forma de uma versão final tentativa para regulamentação de protetores solares nos EUA. Como o FDA é um órgão regulamentador, esse documento possui caráter regulador, além do fato de protetores solares serem considerados como OTC (*over-the-counter* – medicamento de venda livre) naquele país. A primeira versão emitida foi em 25 de agosto de 1978.

A Metodologia apresentada contempla a inclusão de 25 voluntários no máximo gerando pelo menos 20 resultados válidos. O número de voluntários deve ser previamente estabelecido ao início do estudo. É necessário que esse voluntário seja avaliado no primeiro dia do estudo para verificar atendimento a todos os critérios de inclusão. A norma FDA exige, já neste primeiro dia, a determinação da MDE da pele não protegida, esta é comumente chamada de pré-MDE. Neste dia não ocorre a aplicação dos produtos a serem avaliados. No segundo dia, faz-se a leitura da pré-MDE e, com base nesse valor, realiza-se o estudo propriamente dito com a nova avaliação da MDE da pele não protegida ajustada pela determinação da pré-MDE e a aplicação do produto e irradiação dos mesmos para a determinação da MDE da pele protegida. No terceiro dia, ocorre a leitura clínica final da MDE para a pele não protegida e para a pele protegida.

A exposição do voluntário ocorre através de vários níveis de intensidade energética pré-determinados. A Norma FDA1993 especifica níveis progressivos de intensidades energéticas em função do FPS esperado. No final do estudo, determina-se a média e o intervalo de confiança *t de student* a 95% de significância do conjunto de valores de FPS individuais obtidos. O valor do FPS a ser declarado no rótulo do produto é definido como o maior número inteiro menor que a diferença entre o valor médio do conjunto de dados e o desvio calculado pelo intervalo de confiança.

O documento apresenta vários critérios de rotulagem que devem ser obedecidos e rege, inclusive, quais frases podem ou devem ser citadas no produto. O máximo valor de FPS permitido para declaração em rótulo é “30”. Os produtos que apresentam FPS

superiores a 30 devem ser rotulados como “30+” ou pode-se utilizar a designação da categoria do produto (DCP) conforme apresentado na tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Designação de categoria de produto conforme monografia FDA 1993.

| <i>Fator de Proteção do Produto</i> | <i>Designação da Categoria do Produto</i>              |
|-------------------------------------|--|
| FPS<2                               | Produto não pode ser classificado como protetor solar. |
| 2=FPS<4                             | Proteção mínima  |
| 4=FPS<8                             | Proteção moderada                                      |
| 8=FPS<12                            | Proteção alta  |
| 12=FPS<20                           | Proteção muito alta                                    |
| FPS=20                              | Proteção ultra-alta                                    |

Fonte: FDA (1993).

A monografia FDA1993 rege, também, procedimento para a determinação da resistência à água do produto. Na avaliação de resistência à água do protetor solar, o voluntário deve permanecer imerso em água por períodos de 20 minutos de imersão separados por períodos de secagem de 20 minutos fora da água. Durante os períodos de secagem, não se deve utilizar qualquer recurso para secagem da área onde o produto foi aplicado. O número de ciclos de imersão e secagem varia com o benefício que se deseja explorar. Um produto que apresente resistência a um tempo total de imersão de 40min pode ser rotulado como “Resistente à Água” e se o produto apresentar resistência a um tempo total de imersão de 80min ele poderá ser declarado como “Muito Resistente à Água”.

Para que o produto possa ser classificado como “Resistente à Água” ou “Muito Resistente à Água” o valor do FPS após a imersão, seguindo os mesmos critérios estatísticos aplicados na determinação do FPS a seco, deve estar na mesma DCP que o produto apresenta na condição a seco, ou seja, antes da imersão.

Caso os critérios para rotulagem de produtos como “Resistente à Água” ou “Muito Resistente à Água” sejam atingidos; os produtos poderão, também, declarar “Resistência ao Suor”.

### **5.1.2 Método COLIPA-1994 para a determinação do FPS de protetores solares**

A COLIPA é uma associação das indústrias cosméticas e de perfumaria da Europa que existe desde 1962. Em 1990 estabeleceu uma “força trabalho” para definir os métodos de determinação do fator de proteção solar aceitáveis pela indústria europeia. Finalmente, em outubro de 1994, houve a emissão do documento final dessa metodologia.

A Metodologia apresentada contempla a inclusão de, no máximo, 20 voluntários com, pelo menos, 10 resultados válidos. O número de voluntários inicia-se com 10 e pode ser aumentado, de acordo com a necessidade para cumprimento do critério estatístico para aceitação do conjunto de dados. No primeiro dia do estudo, realiza-se a confirmação da MDE para a pele não protegida simultaneamente à avaliação do FPS do produto, ou seja, a MDE da pele protegida. Note que esta é uma importante diferença em relação à metodologia FDA1993, que exige a execução da pré-MDE em dia anterior à avaliação do produto.

A definição dos níveis de energia UV a que o voluntário será exposto é baseada na determinação do fototipo do voluntário. Como parâmetro na definição do fototipo, a COLIPA, além da avaliação clínica como definida por Fitzpatrick, aplica também a determinação do ângulo tipológico individual (ITA<sup>o</sup>) conforme descrito por Chardon *et al* (1990). Este parâmetro utiliza o espaço de cor L\*a\*b (CIE -1976) em sua definição.

O ITA<sup>o</sup> é um parâmetro bastante útil na caracterização do fototipo do voluntário e é definido como segue na equação 5.1 abaixo:

$$\text{ITA}^{\circ} = [\text{Arco Tangente } ((L^* - 50) / b^*)] 180 / \pi \quad (\text{Eq.5.1})$$

As categorias de cor de pele são, então, definidas como expressa a tabela abaixo.

Tabela 6. Categorias de cor da pele em função do ITA<sup>o</sup>.

| <i>Categorias de Cor da Pele</i> | <i>Valores de ITA<sup>o</sup></i> |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Muito Clara                      | >55°                              |
| Clara                            | 41 a 55°                          |
| Intermediária                    | 28 a 41°                          |
| Bronzeada                        | 10 a 28°                          |
| Marrom                           | -30 a 10°                         |
| Negra                            | < -30°                            |

Fonte: COLIPA (2004)

No segundo dia, faz-se a leitura clínica das MDE's para determinação do FPS dos produtos avaliados. Os sítios de avaliação da MDE recebem níveis de energia UV pelo uso do simulador solar em doses incrementais de 25%, tanto no caso da pele não protegida quanto daquela protegida para todos os valores de FPS avaliados.

No final do estudo, determina-se a média e o intervalo de confiança *t de student* a 95% de significância do conjunto de valores de FPS individuais obtidos. Para se determinar o valor de FPS a ser considerado para a rotulagem, o valor médio deve ser arredondado para baixo de acordo com o número mais próximo apresentado na tabela 7 abaixo (COLIPA, 2002).

Tabela 7. Classificação de protetores solares segundo norma COLIPA 1994

| <i>Fator de Proteção do Produto</i> | <i>Designação da Categoria do Produto</i> |
|-------------------------------------|---|
| 2 – 4 – 6                           | Baixo                                     |
| 8 – 10 – 12                         | Médio                                     |
| 15 – 20 – 25                        | Alto                                      |
| 30 – 40 – 50                        | Muito Alto                                |
| 50+                                 | Ultra                                     |

Fonte: COLIPA (2002).

O máximo valor de FPS para rotulagem do protetor solar regido pela norma COLIPA1994 é “50”. Os produtos que apresentarem FPS superior a 60 devem ser rotulados como “50+”. A DCP também pode ser utilizada para rotulagem dos produtos.

Por ocasião da emissão da norma COLIPA1994, não havia uma comunicação oficial quanto aos procedimentos para teste e rotulagem de resistência à água. Porém, era prática entre as empresas e instituições de pesquisas correlacionadas, a adoção de procedimento similar ao apresentado anteriormente pela monografia FDA1993: Na avaliação de resistência à água do protetor solar, o voluntário deve permanecer imerso em água por períodos de 20 minutos de imersão separados por períodos de secagem de 15 minutos fora da água. Durante os períodos de secagem, não se deve utilizar qualquer recurso para secagem da área onde o produto foi aplicado. Novamente, assim como na monografia FDA1993, o número de ciclos de imersão e secagem varia com o benefício que se deseja explorar. Um produto que apresente resistência a um tempo total de imersão de 40min pode ser rotulado como “Resistente à Água” e se o produto apresentar resistência a um tempo total de imersão de 80min ele poderá ser declarado como “Muito Resistente à Água”.

Para que o produto possa ser classificado como “Resistente à Água” ou “Muito Resistente à Água” o valor do FPS após a imersão deve ser maior que 50% do valor do FPS determinado a seco.

Apenas em 2004, este procedimento foi melhor definido e oficialmente publicado pela COLIPA sob o título *Guidelines for Evaluating Sun Product Water Resistance* (COLIPA, 2004).

### **5.1.3 Método FDA 1999 para a determinação do FPS e da resistência a água de protetores solares**

A monografia FDA1999 é a versão final da monografia tentativa emitida em 1993. A diferença principal em termos de metodologia de avaliação do FPS encontra-se no critério para rotulagem de produtos que se declaram “Resistente à Água” ou “Muito Resistente à Água”. Segundo a monografia FDA1993, o valor do FPS rotulado pode ser aquele obtido no teste de FPS antes da imersão, desde que o produto mantenha um FPS após imersão dentro da mesma DCP. No caso da monografia FDA1999, o valor de FPS a ser declarado em rótulo deve ser aquele obtido após os períodos de imersão em água (FDA, 1999).

### **5.1.4 Método Internacional COLIPA/JCIA/CTFA-AS – 2003 para determinação do FPS.**

Como mencionado anteriormente, No ano 2000, a COLIPA, a JCIA e a CTFA-SA iniciaram discussão sobre harmonização dos métodos de medidas de FPS. Finalmente, em Outubro de 2002, um método de teste internacional para a determinação do FPS foi alcançado (COLIPA, 2003).

A metodologia consiste basicamente dos mesmos procedimentos adotados na COLIPA-1994, porém com importantes alterações. Os sítios de avaliação da MDE recebem níveis de energia UV pelo uso do simulador solar em doses incrementais de 25% apenas para o produto com FPS esperado menor ou igual a 25. Para o produto com FPS esperado superior a 25, as dose incrementais são reduzidas para 12%.

Outra importante diferença desta norma em relação à COLIPA1994 é a alteração da especificação do espectro padrão para simulador solar (COLIPA, JCIA e CTFA-AS;

2003). A seguir, a tabela 8 compara algumas das mais relevantes normas internacionais que regulamentam procedimentos de teste e rotulagem de protetores solares.



|                                   |   |  |   |   |  |   |
|-----------------------------------|---|--|---|---|--|---|
| 5) Área para aplicação do produto | ≥ 50 cm <sup>2</sup> e aleatorizadas  | ≥ 35 cm <sup>2</sup> e aleatorizadas   | ≥ 50 cm <sup>2</sup> e aleatorizadas  | ≥ 30 cm <sup>2</sup> e aleatorizadas                              | ≥ 20 cm <sup>2</sup> separados por no mínimo 1 cm de distância.      | mínimo 30 cm <sup>2</sup> e máximo 60 cm <sup>2</sup> separados por no mínimo 1 cm de distância.          |
| 6) Número de sublocais            | No mínimo 3; 5 para MDE da pele não protegida; 7 para MDE da pele protegida | No mínimo 5  | No mínimo 3; 5 para MDE da pele não protegida; 7 para MDE da pele protegida | Mínimo de 5.  | -  | Mínimo de 5, separados no mínimo 0,8cm.   |
| 7) Dimensões dos sublocais        | No mínimo 1cm <sup>2</sup>  | No mínimo 0,5 cm <sup>2</sup> , recomenda-se 1cm <sup>2</sup> , separados por no mínimo 1 cm de distância  | No mínimo 1cm <sup>2</sup>  | Mínimo 1 cm <sup>2</sup> separados por >1 cm                      | ≥ 0.5 cm <sup>2</sup>  | No mínimo 0,5 cm <sup>2</sup> , recomenda-se 1cm <sup>2</sup> . Separados por no mínimo 1 cm de distância |
| 8) Produto(s) padrão(ões)         | Padrão de homosalato (HMS) a 8%. FPS= 4                                     | PI (DIN K17N) para FPS baixo= 2,7% de OMC. FPS=4<br>Padrão P2 (CTFA/JCIA) para FPS alto= 7% de octil dimetil paba e 3% de OXI. FPS=12<br>Padrão P3 (Bayer C202/101) para FPS alto (UVB e UVA) = 3% de OMC, 0,5% de AVO e 2,78% de PBIS. FPS=15 | Padrão de homosalato a 8%. FPS= 4   | Padrão de HMS a 8%. FPS= 4,47.<br>Padrão P3 para FPS altos (≥15). | Se 2<FPS=20: Padrão HMS 8% - FPS=4<br>Se FPS>20: Padrão P3. FPS= 15. | Se FPS<20: Padrões P1(2,7% de OMC); P2, P3 ou P7 (HMS a 8%)<br>Se FPS ≥ 20: P2 ou P3                      |

|                                      |   |  |   |   |  |  |
|--------------------------------------|---|--|---|---|--|--|
| 9) Quantidade aplicada               | 2 mg / cm <sup>2</sup> ou 2 µL / cm <sup>2</sup><br>(considerando gravidade específica =1)  | 2,0 ± 0,04 mg/cm <sup>2</sup>                      | 2 mg / cm <sup>2</sup> ou 2 µL / cm <sup>2</sup><br>(considerando gravidade específica =1)  | 2,0 ± 0,1 mg / cm <sup>2</sup>  | 2,0 mg / cm <sup>2</sup>   | 2,00 mg / cm <sup>2</sup> ± 2.5%   |
| 10) Período de espera após aplicação | No mínimo 15 min.   | No mínimo 15 min. e assim que possível             | No mínimo 15 min.   | 15 a 30 min.  | Mínimo de 15 min. e assim que possível   | 15 a 30 min.   |
| 11) Progressão das doses de UV       | <b>FPS&lt;8</b> : 0.64X, 0.80X, 0.90X, 1.00X, 1.10X, 1.25X, 1.56X<br><b>8£FPS£15</b> : 0.69X, 0.83X, 0.91X, 1.00X, 1.09X, 1.20X, 1.44X<br><b>FPS&gt;15</b> : 0.76X, 0.87X, 0.93X, 1.00X, 1.07X, 1.15X, 1.32X<br>X= FPS esperado | Geométrica, 25%; com ponto central no FPS esperado | <b>FPS&lt;8</b> : 0.64X, 0.80X, 0.90X, 1.00X, 1.10X, 1.25X, 1.56X<br><b>8£FPS£15</b> : 0.69X, 0.83X, 0.91X, 1.00X, 1.09X, 1.20X, 1.44X<br><b>FPS&gt;15</b> : 0.76X, 0.87X, 0.93X, 1.00X, 1.07X, 1.15X, 1.32X<br>X= FPS esperado | <b>2&lt;FPS&lt;25</b> : geométrica, 25%; com ponto central no FPS esperado.<br><b>FPS<sup>≥</sup>25</b> : v1.25; com ponto central no FPS esperado. | <b>FPS=20</b> : geométrica, 25%; com ponto central no FPS esperado.<br><b>20&lt;FPS=30</b> : geométrica, 15%; com ponto central no FPS esperado<br><b>FPS&gt;30</b> : geométrica, 10%; com ponto central no FPS esperado | <b>FPS=25</b> : geométrica, 25%; com ponto central no FPS esperado.<br><b>FPS&gt;25</b> : geométrica, 12%; com ponto central no FPS esperado.                                    |
| 12) Resistência à água               | Resistente à água: 40min.<br>Muito resistente à água: 80min – Ciclos de 20 min de imersão seguidos de 20 min fora da água   | Não contemplado                                    | Resistente à água: 40min. Muito resistente à água: 80min – Ciclos de 20 min de imersão seguidos de 20 min fora da água  | Resistente à água: 40 min.<br>Muito resistente à água: 80min – Ciclos de 20 min de imersão seguidos de 5 min fora da água.                          | Não abrange metodologias e critérios para resistência à água.  | Procedimento específico em documentação separada.<br>Resistente à água: 40 min.<br>Muito resistente à água: 80min – Ciclos de 20 min de imersão seguidos de 15 min fora da água. |

|  |   |   |  |   |   |  |
|--|---|---|--|---|---|--|
| 13) Tempo para leitura da MDE                                | 22 a 24h após a irradiação  | 16 a 24h após a irradiação  | 22 a 24h após a irradiação   | 16 a 24h após a irradiação  | 16 a 24h após a irradiação  | 16 a 24h após a irradiação   |
| 14) FPS em rotulagem   | <p>FPS= Maior número inteiro menor que a média aritmética dos FPS's individuais menos o valor <math>t_{student}</math> para intervalo de confiança de 95%.</p> <p>Para produtos resistentes à água: FPS após imersão na mesma DCP que o FPS a seco (antes da imersão)</p> | <p>Valor médio do conjunto dos FPS's individuais deve ser arredondado para baixo de acordo com o número mais próximo apresentado na tabela de DCP</p> | <p>FPS= Maior número inteiro menor que a média aritmética dos FPS's individuais menos o valor <math>t_{student}</math> para intervalo de confiança de 95%.</p> <p>Para produtos resistentes à água: FPS de rótulo deve ser aquele determinado após imersão em água</p> | <p>Arredondamento da média para maior número inteiro menor que a média do conjunto de dados de FPS's individuais. Uso da média para classificação pela DCP. Máx: FPS30 ou FPS30+ FPS&lt;4 – não pode ser rotulado como resistente à água FPS≥4 – rotulagem de acordo com Tabela 2 da norma</p> <p>O erro padrão médio do conjunto de FPS's individuais de ser &lt;7%. Valor individual maior ou menor que 25% do valor médio deve ser excluído.</p> | <p>Média Aritmética FPS<sub>i</sub> ± IC95%</p> <p>Para amostras com FPS 50: se L.I. IC 95% &gt; 51,0 ≥ 50+, caso contrário, FPS 50</p> | <p>Valor médio do conjunto dos FPS's individuais deve ser arredondado para baixo de acordo com o número mais próximo apresentado na tabela de DCP.</p> <p>Para produtos resistentes à água: FPS após imersão deve ser superior a 50% do valor do FPS a seco.</p> |
| 15) Critério estatístico para aceitação do conjunto de dados | <p>Regido pelo próprio critério de rotulagem do FPS</p> <p>(Ver item 14)</p>  | <p>Intervalo de confiança de 95% deve estar contido no intervalo do FPS médio ± 20%.</p>  | <p>Regido pelo próprio critério de rotulagem do FPS</p> <p>(Ver item 14)</p>   | <p>O desvio padrão deve ser menor que 10% do FPS médio.</p>   | <p>Intervalo de confiança de 95% deve estar contido no intervalo do FPS médio ± 17%.</p>  | <p>Intervalo de confiança de 95% deve estar contido no intervalo do FPS médio ± 17%.</p>   |

### **5.1.5 Método IPD para a determinação da proteção UVA de protetores solares**

Esta metodologia de avaliação *in vivo* da proteção UVA utiliza como parâmetro biológico a resposta pigmentária imediata da pele, ou seja, a IPD, do inglês *immediate pigment darkening*. A IPD ocorre devido a reações de foto-oxidação em que o precursor incolor da melanina é oxidado se tornando melanina pigmentada (CHARDON, 1997). Com a utilização de pelo menos 10 voluntários, a técnica é baseada no princípio da pigmentação imediata induzida na pele através da irradiação da mesma com somente radiação UVA. Essa pigmentação é obtida através da irradiação UVA com energia aproximada de  $1,2 \text{ J/cm}^2$ , o que pode variar de acordo com o fototipo do voluntário. Assim como na determinação do FPS, ocorre a irradiação de vários sub-locais no dorso do voluntário em doses progressivas de energia com incrementos geométricos de 25%. Após 2 minutos da exposição é realizada a avaliação da resposta pigmentaria imediata da pele, a IPD. Inicialmente, verifica-se a IPD da pele desprotegida para a determinação da mínima dose pigmentaria da pele sem o produto (MDPsp). O procedimento é repetido após a aplicação do produto e determina-se a mínima dose pigmentária da pele protegida (MDPp). A relação MDPp/MDPsp determina é o fator de proteção UVA IPD (KAIDBED; BARNES, 1991).

Como esse método baseia-se na resposta pigmentária, a metodologia preconiza voluntários de fototipos II a IV. Ele possui vantagens como: baixas doses de UVA empregadas e conseqüentemente rapidez de execução. Entretanto, o método possui limitações como instabilidade na resposta e, conseqüentemente, grande variabilidade nos resultados; por essa razão, esta metodologia é pouco empregada.

### **5.1.6 Método PPD para a determinação da proteção UVA de protetores solares**

Esta segunda metodologia para avaliação *in vivo* do nível de proteção UVA é bastante similar a anterior, porém, neste caso o parâmetro biológico utilizado é a resposta pigmentária persistente da pele, ou seja a PPD (*persistent pigment darkening*).

Diferente da IPD, a PPD é verificada de 2 a 4 horas após a irradiação do voluntário e a mesma exige doses bem mais altas de UVA, aproximadamente  $15\text{J}/\text{cm}^2$ . Esta metodologia é, atualmente, a mais amplamente aceita para a determinação da proteção UVA. O Japão adotou oficialmente a PPD como parâmetro para a avaliação da proteção UVA (JCIA,1997; MOYAL, CHARDON e KOLLIAS, 2000).

## 5.2 Metodologias *in vitro*

Nos últimos 10 anos, numerosos estudos têm sido publicados para se comparar testes *in vivo* utilizando humanos com testes espectroscópicos *in vitro*. Estes estudos são focados tanto na medida do FPS quanto na medida da proteção UVA (FERRERO *et al.*, 2002).

O FPS por definição é determinado *in vivo* com a utilização de humanos e representa o acréscimo em nível de energia requerido para indução de eritema, ou seja, um FPS 4 significa quatro vezes mais energia necessária para se induzir um eritema quando da exposição solar (LABSPHERE, 2006)

A determinação *in vitro* das propriedades de absorção e/ou transmissão dos protetores solares têm sido amplamente praticada utilizando-se uma grande variedade de instrumentos, substratos e técnicas de diluição de soluções (COLE, 2000). Neste trabalho, apresentamos, além da espectroscopia de transmissão, a espectroscopia fotoacústica como importante ferramenta auxiliar na avaliação *in vitro* das propriedades óticas dos protetores solares.

Dentre as técnicas *in vitro* para a determinação do FPS, a mais comumente utilizada é a espectroscopia de transmissão. Faremos aqui uma abordagem rápida dos conceitos fundamentais desta técnica e de como ela tem sido aplicada na avaliação *in vitro* da proteção UV de protetores solares, abordando sua aplicação tanto na previsão do FPS quanto da proteção aos raios UVA. Em seguida, apresentamos conceitos básicos da espectroscopia fotoacústica, técnica empregada neste trabalho, na elaboração de uma proposta de protocolo para uma metodologia *in vitro* para previsão do FPS de produtos fotoprotetores.

### 5.2.1 A espectroscopia de absorção e/ou transmissão

A espectroscopia molecular, baseada nas radiações UV, visível e infravermelha, é largamente utilizada para a identificação de uma miríade de espécies inorgânicas e orgânicas.

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) é muito utilizada para análises quantitativas e, provavelmente, utilizada no mundo inteiro, em laboratórios clínicos e químicos, mais do que qualquer outro procedimento que não sejam técnicas complementares (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992). Na espectroscopia UV-Vis, o comprimento de onda é usualmente expresso em nanômetros ( $1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$ ).

Quando a radiação interage com a matéria, inúmeros processos podem ocorrer, incluindo reflexão, espalhamento, absorção, fluorescência/fosforescência (absorção e re-emissão) e reações fotoquímicas (absorção e quebra de ligações). Em geral, quando se mede um espectro UV-Vis, deseja-se que somente a absorbância ocorra.

Pelo fato de luz ser uma forma de energia, a absorção de luz pela matéria faz com que a energia contida nas moléculas ou átomos aumente. A energia (E) potencial total de uma molécula é geralmente representada como a soma de sua energia eletrônica, vibracional e rotacional.

$$E_{\text{total}} = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} \quad (\text{Eq.5.2})$$

A quantidade de energia que uma molécula possui em cada forma não é um *continuum*, mas uma série de valores discretos. As diferenças na energia dos diferentes estados estão na seguinte ordem:

$$E_{\text{eletrônica}} > E_{\text{vibracional}} > E_{\text{rotacional}} \quad (\text{Eq.5.3})$$

Em algumas moléculas e átomos, fótons de luz UV e visível têm energia suficiente para provocar transições entre diferentes níveis eletrônicos de energia. O comprimento de onda da luz absorvida é aquele que tem a energia requerida para mover um elétron de um nível de energia mais baixo para outro nível de energia mais alto.

Essas transições podem resultar em bandas de absorção muito estreitas em comprimentos de onda altamente característicos da diferença de níveis de energia de espécies absorvedoras. Isso ocorre com átomos (OWEN, 1996).

A absorção molecular de radiação UV e visível geralmente ocorre em uma ou mais bandas eletrônicas de absorção, cada uma composta de numerosos “pacotes” de linhas próximas, porém discretas. Cada linha corresponde à transição de um elétron, de seu estado fundamental, para um dos estados de energia vibracional ou rotacional associado a cada estado eletrônico excitado de energia. Pelo fato de existirem muitos desses estados vibracionais e rotacionais e pelo fato de suas energias diferirem muito pouco entre si, o número de linhas contido numa banda típica é grande e a distância entre essas linhas é pequena.

Dois tipos de elétrons são responsáveis pela absorção de radiação ultravioleta e visível por moléculas orgânicas: elétrons compartilhados que participam diretamente na formação da ligação e são então associados com mais de um átomo e elétrons externos não compartilhados que são encontrados em átomos como o oxigênio, halogênios, enxofre e nitrogênio.

Os comprimentos de onda nos quais uma molécula orgânica absorve, depende do quão próximos seus vários elétrons estão ligados (SKOOG; WEST; HOLLER, 1992)

### 5.2.1.1 Transmitância e absorbância

Quando a luz passa através ou é refletida por uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente ( $I_0$ ) e a radiação transmitida ( $I$ ). A quantidade de luz absorvida é expressa tanto como transmitância como absorbância. Transmitância é usualmente expressa em termos de uma fração de 1 ou como uma porcentagem e é definida como:

$$T = I / I_0 \text{ ou } \%T = (I / I_0) \times 100 \quad (\text{OWEN, 1996}) \quad (\text{Eq.5.4})$$

Quando a luz, monocromática ou heterogênea, incide num meio homogêneo, uma porção dessa luz é refletida, uma porção é absorvida dentro do meio, e a remanescente é transmitida. Se a intensidade da luz incidente é expressa por  $I_0$ , se a luz absorvida por  $I_a$ , a luz transmitida por  $I_t$  e a luz e a luz refletida por  $I_r$ , então:

$$I_o = I_a + I_t + I_r \quad (\text{Eq.5.5})$$

O mérito pela investigação da mudança da absorção da luz com a espessura do meio é geralmente atribuído a Lambert, embora ele tenha, na realidade, continuado a trabalhar e avançar em conceitos que foram desenvolvidos originalmente por Bouguer. Beer, mais tarde, aplicou experimentos similares a soluções de diferentes concentrações e publicou seus resultados um pouco antes daqueles publicados por Bernard. Essa história tão confusa tem sido explicada por Malinin and Yoe. As duas leis separadas que governam a absorção são conhecidas como lei de Lambert e Lei de Beer ou lei de Beer-Lambert. Da combinação das duas tem-se:

$$\log I_o / I_t = a.c.l \quad (\text{Eq.5.6})$$

Onde  $a$  é a absortividade,  $c$  é a concentração e  $l$  é o caminho óptico (JEFFERY; BASSET; MENDHAM, 1989).

A absorbância ( $A$ ) é definida como:

$$A = - \log T \quad (\text{Eq.5.7})$$

Para a maioria das aplicações, os valores de absorbância são usados, pois normalmente, a relação entre absorção e tanto concentração como caminho óptico é linear.

Se um espectro é expresso como absorbância ( $A$ ) em função do comprimento de onda ( $\lambda$ ), as derivadas do espectro são:

$$\text{Ordem zero: } A = f(\lambda) \quad (\text{Eq.5.8})$$

$$\text{Primeira ordem: } \frac{dA}{dI} = f'(I) \quad (\text{Eq.5.9})$$

$$\text{Segunda ordem: } \frac{d^2A}{dI^2} = f''(I) \quad (\text{Eq.5.10})$$

A derivada primeira é a taxa de mudança da absorbância em função do comprimento de onda. Essa derivada começa e termina em zero, passando por zero no mesmo comprimento de onda que é o  $\lambda$  de máxima absorção. Essa derivada tem uma banda positiva e uma banda negativa com máximo e mínimo nos mesmos comprimentos

de onda dos pontos de inflexão. Essa função bipolar é característica de todas as derivadas de ordem ímpar.

A característica mais distinta da derivada segunda é a banda negativa com mínimo no mesmo comprimento de onda que corresponde ao  $\lambda$  máximo da banda de ordem zero. Essa derivada também mostra duas bandas positivas satélites de cada lado da banda principal. Métodos ópticos, eletrônicos e matemáticos podem ser usados para gerar derivadas de espectros.

Espectros no UV-Vis geralmente mostram apenas algumas bandas de absorção. Comparada com técnicas como espectroscopia de infravermelho, que produz várias bandas estreitas, a espectroscopia no UV-Vis fornece uma quantidade limitada de informação qualitativa. A maioria das absorções por compostos orgânicos resultam da presença de ligações  $\pi$ . Um cromóforo é um grupo molecular que contém usualmente uma ligação  $\pi$ . Quando inserido num hidrocarboneto saturado, que não exhibe espectro de absorção no UV-Vis, produz um composto com absorção entre 185 e 1000 nm. A presença de uma banda de absorção num comprimento de onda particular é, freqüentemente, um bom indicador da presença de um cromóforo. Entretanto, a posição do máximo de absorbância não é fixa, mas depende parcialmente do ambiente molecular do cromóforo e no solvente no qual a amostra pode estar dissolvida. Outros parâmetros, como pH e temperatura, também podem causar mudanças tanto na intensidade quanto no comprimento de onda da absorbância máxima.

Conjugar ligações duplas com ligações duplas adicionais provoca o aumento tanto da intensidade como do comprimento de onda da banda de absorção. Para alguns sistemas moleculares como hidrocarbonetos conjugados ou carotenóides, a relação entre intensidade e comprimento de onda tem sido sistematicamente investigada.

Íons de metais de transição também têm níveis de energia eletrônica que provocam absorção de 400 a 700 nm na região do visível.

Embora o espectro UV-Vis não possibilite uma identificação absoluta de uma espécie desconhecida, é freqüentemente usado para confirmar a identidade de uma

substância por meio da comparação do espectro medido com um espectro de referência (OWEN, 1996).

Numa análise espectrofométrica uma fonte de radiação é usada para que se alcance a região ultravioleta do espectro. Comprimentos de onda definidos de radiação são escolhidos de tal forma que exibam largura de banda de menos de 1 nm. Esse processo necessita do uso de um equipamento mais complicado e, conseqüentemente mais caro. O instrumento empregado para esse propósito é um espectrofotômetro.

Um espectrômetro é um instrumento com um sistema óptico que pode produzir uma dispersão da radiação eletromagnética incidente e com o qual pode-se fazer medidas da quantidade da radiação transmitida num comprimento de onda selecionado do intervalo espectral. Um fotômetro é um dispositivo para medir a intensidade da radiação transmitida. Quando combinado com um espectrofotômetro, o espectrômetro e o fotômetro são empregados em conjunto para produzir um sinal correspondente a diferença entre a radiação transmitida de um material usado como referência e aquele de uma amostra em comprimentos de onda selecionados (JEFFERY; BASSET; MENDHAM, 1989).

### 5.2.2 Medida do FPS *in vitro* via espectroscopia de absorção e/ou transmissão

A técnica *in vitro* mais comum para a determinação do FPS envolve a transmissão espectral na região do UV, de 290 a 400nm (LABSPHERE, 2006). O FPS é, então calculado como se segue:

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot dI}{\int_{290nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot T_1 \cdot dI} \quad (\text{Eq.5.11})$$

onde  $E_\lambda$  é a efetividade espectral eritematosa,  $S_\lambda$  é a irradiância solar espectral esperada para um dia de céu limpo ao meio dia no meio do verão numa latitude de  $40^\circ\text{N}$  e  $T_\lambda$  é a transmitância espectral da amostra (DIFFEY, 1998; STOKES, 1999; LABSPHERE, 2006).

As duas funções padrões,  $E_\lambda$  e  $S_\lambda$  são ilustradas nas figuras 6 e 7 abaixo.

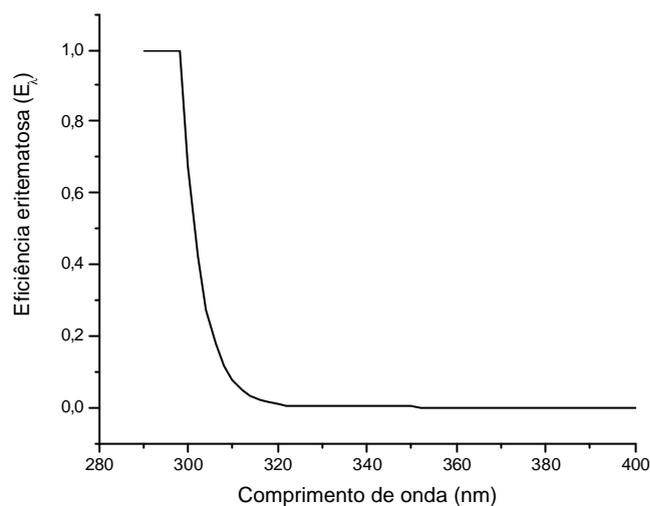


Figura 6. Espectro de ação eritematosa  
Fonte: FDA (1993)

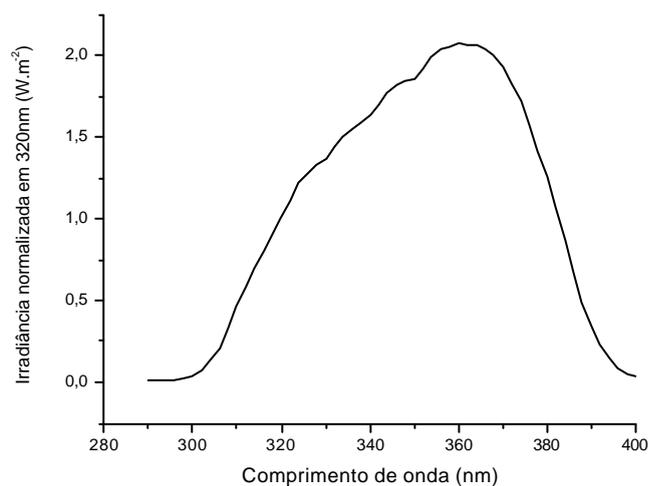


Figura 7. Espectro de irradiância para simulador solar  
Fonte: COLIPA (1994)

As duas funções descrevem a sensibilidade relativa de eritema para comprimentos de onda individuais e a distribuição espectral de um simulador solar.

Um gráfico mais revelador é o do produto  $E_{\lambda} \times S_{\lambda}$ , termos estes que aparecem tanto no numerador quanto no denominador da equação 5.11. Na Figura 8, fica evidente que o FPS é mais fortemente pesado pela transmissão da amostra no intervalo UVB do espectro, com máximo peso ponderal próximo a 305nm (LABSPHERE, 2006)

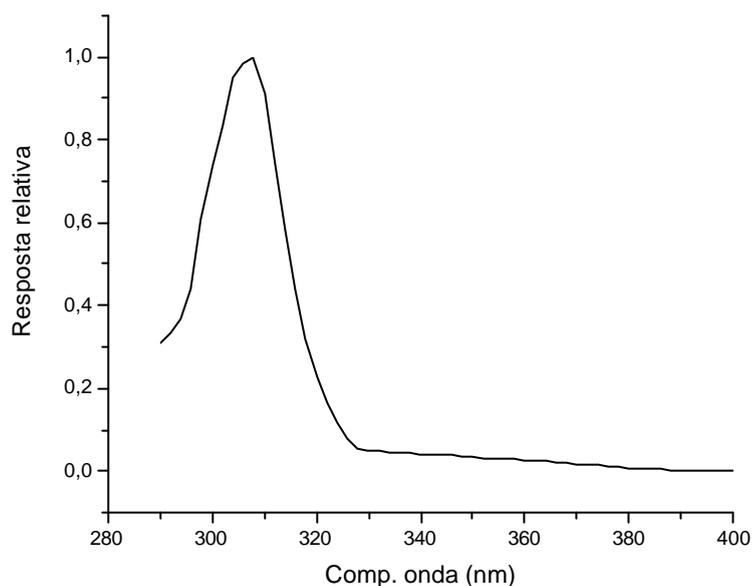


Figura 8. Produto do espectro de ação eritematosa ( $E_{\lambda}$ ) pela irradiância espectral ( $S_{\lambda}$ )  
Fonte: Labsphere (2006)

### 5.2.3 Medida da proteção UVA *in vitro* via espectroscopia de absorção e/ou transmissão.

Diferentes formas de manipulação de dados espectroradiométricos podem ser aplicadas para a determinação da proteção UVA *in vitro*. Consideraremos aqui as mais comuns.

### 5.2.3.1 Fator de proteção UVA médio

A abordagem mais simples para a definição do fator de proteção (FP) UVA a partir dos dados de transmitância é a média aritmética do fator de proteção monocromático,  $FPM(\lambda)$ , de 320 a 400nm. Esta é expressa como a seguir:

$$FP(UVA)médio = \frac{\sum_{320}^{400} FPM(I)\Delta I}{\sum_{320}^{400} \Delta I} \quad (\text{Eq.5.12})$$

onde  $FPM(\lambda)$  é o inverso da transmitância  $T(\lambda)$  no comprimento de onda  $\lambda$ . Este índice considera todos os comprimentos de onda UV com pesos ponderais iguais, e à medida em que o espectro UVA aumenta com o aumento de  $\lambda$ , o  $FP(UVA)$  médio será aumentado devido aos comprimentos de onda mais longos de UVA (DIFFEY, 1998).

### 5.2.3.2 Fator de proteção UVA eritematoso

Embora a radiação UVA constitua cerca de 95 % da radiação UV terrestre, ela contribui apenas com cerca de 20% da queimadura solar (DIFFEY, 1992).

Conseqüentemente, é possível definir um FP UVA eritematoso da mesma forma que para o FPS *in vitro*, com exceção ao fato de que o limite inferior da integral passa a ser 320nm, e não 290nm. Assim,

$$FP\_UVA\_eritematoso = \frac{\int_{320nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot dI}{\int_{320nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot T_1 \cdot dI} \quad (\text{Eq.5.13})$$

A justificativa para a utilização deste índice é o fato de que o espectro de ação eritematosa é um indicador substituto apropriado para outros efeitos biológicos, como envelhecimento e câncer de pele. Contudo, não há dados humanos quem confirmem isto (DIFFEY, 1998).

### 5.2.3.3 Razão entre absorvância UVA e absorvância UVB

Este índice, definido como a razão da absorvância UVA média pela absorvância UVB média, foi proposto por *Boots the Chemist Limited* no Reino Unido (BOOTS, 1992), razão pela qual é muito conhecido como *Boots Star Rating*. É calculado como:

$$RazãoUVA / UVB = \frac{\int_{320nm}^{400nm} A_1 .dI}{\int_{290nm}^{320nm} A_1 .dI} \Bigg/ \frac{\int_{320nm}^{400nm} dI}{\int_{290nm}^{320nm} dI} \quad (Eq.5.14)$$

onde  $A_\lambda$  é a absorvância efetiva e relacionada com a transmitância do protetor solar  $T_\lambda$  por  $A_\lambda = -\log [T_\lambda]$ . A razão da absorvância variará entre zero para produtos que não exibam qualquer proteção contra a radiação UVA até 1 para produtos exibindo absorção igual para todos os comprimentos de onda do espectro UV. Este método permite a classificação dos produtos em categorias como mostra a tabela 9.

Tabela 9. Classificação da proteção UVA segundo sistema *Boots Star Rating*

| <i>Razão UVA/UVB</i> | <i>Classificação UVA</i> |
|----------------------|--------------------------|
| < 0,2                | 0                        |
| ≥0,2 e ≤ 0,4         | 1                        |
| >0,4 e ≤ 0,6         | 2                        |
| >0,6 e ≤ 0,8         | 3                        |
| >0,8                 | 4                        |

Fonte: Diffey (1998)

Este método de definição da proteção UVA fornece uma indicação das propriedades físicas dos ingredientes do protetor solar e, diferentemente do FPS, é independente da concentração e espessura de aplicação.

#### 5.2.3.4 Amplitude da proteção UVA pela determinação do “comprimento de onda crítico”

Uma alteração do método anterior foi realizada para fornecer um novo parâmetro para a medida da “amplitude” da proteção UVA. Este método é muito conhecido como a determinação do “comprimento de onda crítico”. Esta técnica tem sido avaliada e proposta tanto pela COLIPA e CTFA, bem como por companhias individuais (COLE, 2000).

A metodologia baseia-se na utilização de espectroscopia UV acoplada com esfera de integração, onde inicialmente se determina a curva de absorvância de um filme fino do produto a ser avaliado na faixa de 290 a 400nm. A absorvância é então somada, iniciando-se em 290nm, seqüencialmente nos comprimentos de onda do UV até que se alcance 90% da absorvância total do protetor solar no intervalo de 290 a 400nm. O comprimento de onda no qual a absorvância somada atinge 90% da absorvância total é definido como o comprimento de onda crítico ( $\lambda_c$ ) e é considerado como uma medida de quão ampla é a proteção solar fornecida pelo produto (COLE, 2000). O cálculo do  $\lambda_c$  pode, então, ser determinado com na equação 5.15 abaixo.

$$\int_{290\text{ nm}}^{\lambda_c} A_{\lambda} .d\lambda = 0,9 \int_{290\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A_{\lambda} .d\lambda \quad (\text{Eq.5.15})$$

onde  $A_{\lambda}$  é a absorvância do produto no comprimento de onda  $\lambda$ . Este método também permite a classificação dos produtos em 5 diferentes categorias como mostra a tabela 10.

Tabela 10. Classificação da proteção UVA em função do comprimento de onda crítico.

| $I_c(nm)_-$        | <i>Classificação Amplo Espectro</i> |
|--------------------|-------------------------------------|
| < 325              | 0                                   |
| $\geq 325$ e < 335 | 1                                   |
| $\geq 335$ e < 350 | 2                                   |
| $\geq 350$ e < 370 | 3                                   |
| $\geq 370$         | 4                                   |

Fonte: Diffey (1998)

Este método não apresenta qualquer relação com o espectro de ação para efeitos fotobiológicos imediatos ou de longo prazo. Contudo, é um fato reconhecido que a eficiência dos raios UV em induzir um dano fotobiológico tende a decrescer com o aumento do comprimento de onda crítico do protetor (DIFFEY, 1998).

#### 5.2.4 A espectroscopia fotoacústica

A espectroscopia fotoacústica se baseia na produção de ondas acústicas em uma câmara fechada contendo ar em contato com o material analisado. A amostra é exposta a uma luz monocromática com uma determinada frequência de modulação. A absorção de luz modulada gera ondas acústicas, produzindo oscilações de pressão, que são responsáveis pelo sinal fotoacústico. A técnica fotoacústica permite que se selecione a espessura da amostra a ser estudada, conforme a frequência de modulação incidente. Nos últimos anos, essa técnica tem sido muito aplicada em diversas áreas da ciência, particularmente no estudo de sistemas biológicos. Assim a pele humana pode ser caracterizada por meio da espectroscopia fotoacústica por se tratar de um sistema multicamadas, obtendo-se diferentes espectros em diferentes profundidades da amostra. A espectroscopia fotoacústica permite caracterizar amostras de pele de diferentes regiões do corpo (ROMPE *et al.*, 2005).

Uma das principais vantagens da espectroscopia fotoacústica a possibilidade de se obter espectros semelhantes aos de absorção óptica de vários tipos de amostras sejam, sólidas ou semi-sólidas, que podem ser cristalinas, ter forma de pó, podem ser amorfas ou em forma de gel (ROSENCWAIG; GERSHO, 1975).

Técnicas fototérmicas têm sido utilizadas com frequência na análise sistemas biológicos complexos como a pele humana. A espectroscopia fotoacústica apresenta sucesso nos resultados de caracterização da pele humana, bem como nos estudos de penetração de fármacos de uso tópico.

O uso da técnica fotoacústica na dermatologia não é novidade, tendo se iniciado em 1977 com Rosencwaig. Os estudos envolvendo aplicação de cosméticos começam em 1978 e um dos temas de interesse é a análise do fator de proteção contra a radiação ultravioleta dos protetores solares (ANJOS *et al.*, 2004).

Em 1880 Graham Bell descobriu o efeito fotoacústico, quando notou que a incidência da luz modulada num diafragma conectado a um tubo produzia som. Graham Bell estudou esse efeito em líquidos e gases, mostrando que a intensidade do sinal acústico observado dependia da absorção da luz pelo material.

A ausência de um detector para o sinal fotoacústico fez com que o interesse nessa área declinasse, até a invenção do microfone. Ainda assim, a pesquisa nessa área manteve-se restrita a aplicações na análise de gases até por volta de 1973, quando Rosencwaig começou a usar a técnica fotoacústica em estudos espectroscópicos de sólidos e, juntamente com Gersho, desenvolveu uma teoria para o efeito fotoacústico em sólidos, o modelo de Rosencwaig-Gersho (BARJA, 2000).

O modelo de Rosencwaig-Gersho é também chamado de “pistão acústico”, Nesse modelo, a luz modulada é absorvida pela amostra e convertida total ou parcialmente em calor. O calor modulado produzido na amostra difunde-se até o gás em contato com esta, dentro da célula fotoacústica. O modelo Rosencwaig-Gersho assume que, com a difusão do calor da amostra para o gás adjacente, a camada de gás mais próxima da amostra sofre expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no restante do gás. Numa câmara fechada, as variações de pressão assim

produzidas geram ondas acústicas, que podem ser captadas por um microfone (ROSENCWAIG; GERSHO, 1976).

Para descrever a variação da temperatura com o tempo, é necessário levar em conta a conservação local de energia, o que origina a equação de difusão térmica. A equação de difusão térmica unidimensional é dada por:

$$(1/\alpha) \partial T(x,t) / \partial t = \partial^2 T(x,t) / \partial x^2 + s(x,t) / k \quad (\text{Eq.5.16})$$

onde  $\alpha$  é a difusividade térmica (em  $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$ ),  $k$  é a condutividade térmica (em  $\text{W}.\text{cm}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura,  $t$  é o tempo e  $r$  é a distância de propagação. O último termo da equação é o chamado “termo de fonte”, sendo nulo em regiões onde não há fonte de calor.

A solução matemática para a variação de temperatura na amostra e na camada de ar adjacente mostra que ela se comporta como uma onda evanescente espacial, o que significa que ela diminui exponencialmente com a distância relativa ao ponto de absorção da luz. Isso permite definir o chamado *comprimento de difusão térmica* e dois regimes térmicos: se o comprimento de difusão térmica for maior que a espessura do material, diz-se que o regime é termicamente fino; caso contrário, o regime é chamado de termicamente grosso. O comprimento de difusão térmica depende da frequência de modulação da luz, de tal modo que o aumento da frequência de modulação permite passar do regime termicamente fino ao termicamente grosso (BARJA, 1996).

Na solução matemática do modelo de Rosencwaig-Gersho, a expressão para a amplitude complexa da temperatura é a seguinte:

$$Q = \frac{bl_0 \mathcal{P}_0}{2\sqrt{2}k_s l_g a_g T_0 (b^2 - s^2)} \left( \frac{(r-1)(b+1)e^{s s l} - (r+1)(b-1)e^{-s s l} + 2(b-r)e^{-bl}}{(g+1)(b+1)e^{s s l} - (g-1)(b-1)e^{-s s l}} \right) \quad (\text{Eq.5.17})$$

Nesta expressão,  $\beta$  é o coeficiente de absorção óptica da amostra analisada,  $I_0$  é intensidade da radiação incidente,  $\gamma$  é o quociente dos calores específicos,  $P_0$  é a pressão atmosférica,  $k_A$  é a condutividade térmica e  $l_A$ , a espessura do material A,  $T_0$  é a temperatura ambiente,  $\sigma_A = (1+i) a_A$ ,  $a_A = (\omega / 2\alpha_A)^{1/2}$  é o coeficiente de difusão térmica

do material  $A$ ,  $b = k_b a_b / k_s a_s$ ,  $g = k_g a_g / k_s a_s$  e  $r = (1 - i)(\beta / 2\alpha_s)$ . Os índices  $s$ ,  $g$  e  $b$  são usados respectivamente para amostra sólida, gás da câmara e base da câmara.

Embora esta expressão seja bastante complexa, uma análise das aproximações utilizadas para diferentes configurações experimentais mostra que, para amostra opaca e termicamente grossa, caso de interesse para o presente trabalho, o sinal é proporcional ao coeficiente de absorção da amostra ( $\beta$ ), o que permite obter o espectro fotoacústico de absorção das amostras analisadas (ROSENCWAIG, 1980).

A detecção do sinal fotoacústico ocorre da seguinte maneira: a amostra absorve a luz modulada incidente, produzindo calor e, conseqüentemente, ondas térmicas. De acordo com o modelo de Rosencwaig-Gersho, essas ondas geram uma oscilação de pressão que é detectada como sinal fotoacústico.

Essa técnica apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas espectroscópicas como: medida direta de absorção (a luz transmitida ou refletida não interfere nas medidas), possibilita estudos em amostras opticamente opacas e em amostras que provocam muito espalhamento de luz, que não podem ser analisadas por técnicas espectroscópicas convencionais. Outra vantagem é que como a difusão térmica depende da frequência de modulação, essa técnica possibilita a análise de amostras multicamadas em suas várias profundidades.

A célula fotoacústica aberta é um dispositivo formado por um microfone elétrico que usa sua própria câmara com uma célula acústica. Nesse arranjo a própria amostra fecha a câmara fotoacústica, com a ajuda de uma graxa ao redor do microfone que veda a câmara hermeticamente. Marquezini *et al.* apresentam a teoria da detecção da célula fotoacústica aberta considerando que, para amostras opticamente transparentes, existem duas fontes de sinal: parte da luz é absorvida e outra é transmitida, sendo absorvida pelo diafragma metalizado do microfone. Esses autores usam a lei de Gauss para mostrar a equivalência entre um microfone eletrônico e um circuito eletrônico em paralelo com uma fonte de corrente proporcional à razão de mudança da deflexão do diafragma. Essa razão de mudança é relacionada com o fluxo de calor pelo modelo de Rosencwaig-Gersho, então a voltagem da célula fotoacústica aberta pode ser expressa como função

da flutuação da temperatura, obtida através da equação de difusão térmica (Marquezini *et al. apud* BARJA, 2000).

A espectroscopia fotoacústica tem sido cada vez mais usada para estudar moléculas biológicas, organelas, células e tecidos nos últimos anos. Além das vantagens citadas, pode-se citar outras como: a possibilidade de obter informações que não são acessíveis a técnicas convencionais, como danos causados por radiação UV em moléculas, transferência de energia inter-molecular *in vivo* e *in vitro*, interações inter-moleculares *in situ*, caracterização de componentes dentro das células, processos de armazenamento de energia, dissipação foto-térmica *in vivo* (BALASUBRAMANIAN; RAO, 1986).

Na área de dermatologia, a espectroscopia fotoacústica é usada com o objetivo de se estudar as propriedades de hidratação do estrato córneo e o comportamento de distribuição e difusão dos ativos dos medicamentos na pele. A maioria dos resultados experimentais foi obtida por meio de medidas *in vitro*. A espectroscopia fotoacústica pode ser utilizada para fazer medidas *in vivo* também. Para essa aplicação a célula deve ser aberta em uma das extremidades. Aqui um sistema auto-isolante do volume do gás é conseguido por meio de uma pressão exercida pela própria pele na célula. Quando a terminação da célula fotoacústica é feita por um tecido vivo e macio, geram-se algumas dificuldades experimentais como: alto ruído causado pelo deslocamento da superfície da pele devido à pulsação do fluxo sanguíneo através dos vasos subcutâneos e o tremor dos músculos. Entretanto, recentes progressos na tecnologia dos detectores fotoacústicos reduziram significativamente esse problema (GIESE; KÖMEL, 1985).

A técnica fotoacústica pode ser uma técnica de muito valor na análise da proteção oferecida por alguns protetores solares comerciais (ANJOS *et al.*, 2004). Desde os trabalhos pioneiros de Rosencwaig e Pines, os quais foram feitos para avaliar a penetração de protetores solares na pele, a espectroscopia fotoacústica tem mostrado ser de muito valor para avaliar a penetração de substâncias através da pele, tanto *in vitro* como *in vivo* (SEHN *et al.*, 2003).

---

**OBJETIVO**

## **6. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho é apresentar um estudo de otimização de método para a determinação do FPS *in vitro* utilizando a técnica fotoacústica.

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

Dois diferentes sistemas de espectroscopia foram empregados para se obter a curva de absorção de quatro produtos protetores solares comercialmente disponíveis, com diferentes fatores de proteção solar. As técnicas espectroscópicas utilizadas foram a de absorção acoplada com detector de esfera de integração e a fotoacústica.

Na investigação com espectroscopia óptica de absorção, dois diferentes substratos foram empregados: a placa de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e a pele sintética VitroSkin®. Os produtos foram aplicados em duas diferentes concentrações para cada um dos substratos estudados: 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

Nas medidas de espectroscopia fotoacústica, apenas o substrato de pele sintética VitroSkin® foi empregado e os produtos também foram aplicados em duas concentrações; 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

### 7.1 Produtos estudados

Quatro produtos protetores solares disponíveis no mercado brasileiro foram empregados no estudo. Os produtos apresentam os seguintes FPS's declarados em rótulo: 8, 15, 20 e 30. Os produtos foram escolhidos em função de apresentarem em sua constituição mesmo sistema emulsificante e mesmo sistema formador de filme, conforme informado no rótulo; porém, diferentes teores de filtros UV empregados, conforme a tabela 11.

Tabela 11. Teor de filtros UV empregados nos produtos estudados

| <i>Filtro UV</i>                         | <i>[ ]%p/p</i> |               |               |               |
|--|----------------|---------------|---------------|---------------|
|  | <i>FPS 8</i>   | <i>FPS 15</i> | <i>FPS 20</i> | <i>FPS 30</i> |
| Metoxinamato de etilhexila               | 5,5            | 7,5           | 7,5           | 7,5           |
| Bis-etilexiloxifenolmetoxifenil triazina | 0,5            | 0,5           | 0,9           | 2,5           |
| Dióxido de titânio                       | 0,0            | 1,5           | 1,0           | 1,0           |

## 7.2 Substratos

Dois diferentes substratos foram empregados: placa de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e pele sintética VitroSkin®.

A placa de PMMA empregada no estudo foi adquirida da empresa Alemã Schönberg GMBH & Co. KG. Este material apresenta características físicas bem definidas, conforme norma DIN (2004): 2,5mm de espessura; um dos lados de superfície com rugosidade padrão conferida por unidade de jato de areia carregada com grânulos de tamanho definido entre 90 e 150 $\mu$ m; pressão de operação de 6bar e distância de trabalho de 30cm; transmitância em  $\lambda=400$ nm entre 70 e 80%. As placas foram posteriormente cortadas em corpos de prova de 5 x 5cm.

A pele sintética VitroSkin® é um substrato de teste produzido por IMS Inc., uma empresa sediada nos Estados Unidos. Este material é constituído de proteína otimizada e componentes lipídicos. Foi desenvolvido para apresentar características físicas e químicas similares à pele humana como: topografia na região das costas, pH, tensão superficial crítica e força iônica. Esse material tem sido extensivamente utilizado para avaliações *in vitro* (IMS, 2006).

## 7.3 Montagem experimental

### 7.3.1 Espectrofotômetro de absorção

O espectrofotômetro de absorção utilizado foi o Analisador de Transmitância Ultravioleta Labsphere UV-1000S, fabricado por Labsphere Inc., EUA. Este equipamento possui o sistema óptico de esfera de integração, que coleta a luz transmitida em todas as direções após a passagem desta através de um substrato contendo a amostra a ser avaliada (LABSPHERE, 2006). As paredes internas da esfera de integração são revestidas com um material branco, altamente refletivo. Na figura 9, a luz de uma fonte externa é colimada e atinge a amostra numa incidência normal. O fotodetector responderá proporcionalmente à iluminação interna produzida nas paredes da esfera. O defletor evita a iluminação direta do detector após o espalhamento da luz pela amostra. O fluxo de luz incidente é inicialmente gravado sem a amostra para que se possa determinar a medida de referência.

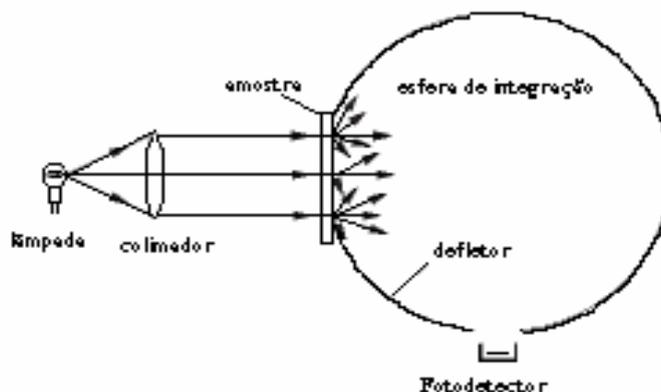


Figura 9. Esquema de funcionamento de um sistema de detecção com esfera de integração.  
Fonte: LABSPHERE, 2006.

A geometria mostrada na figura 9 é conhecida como normal/hemisférica, o que se refere à condição iluminação/detecção. Essa geometria é frequentemente abreviada

como  $0^\circ/h$  ou mais comumente, como geometria  $0^\circ/d$  (difusa). Pelo princípio de reciprocidade de Helmholtz, a perda de fluxo de luz dentro do sistema não será alterada se a direção de viagem da luz for reversa. Aplicando para instrumentos, o resultado não será alterado se a geometria de iluminação e detecção forem alternadas. A engenharia ótica faz uso frequente deste princípio em cálculos de medidas de luz (LABSPHERE, 2006).

O UV-1000S é construído na configuração hemisférica/normal, frequentemente abreviada como  $h/0^\circ$  ou mais comumente  $d/0^\circ$ , conforme ilustração da figura 10.

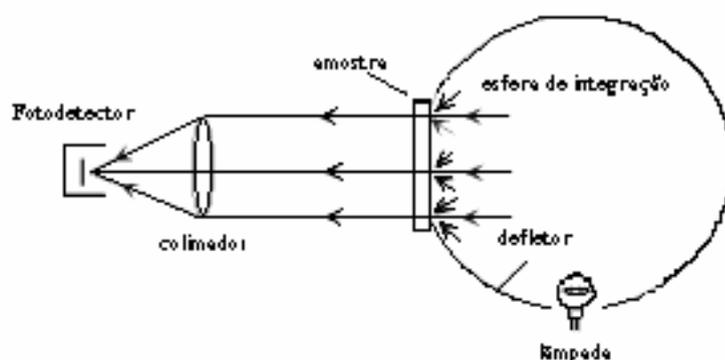


Figura 10. Configuração iluminação/detecção  $d/0^\circ$  empregada no UV1000S.  
Fonte: Labsphere,(2006).

Pode parecer que a geometria ótica de iluminação difusa irá produzir diferentes resultados de medidas que aqueles conseguidos pela iluminação colimada uma vez que muito mais raios incidentes de diferentes ângulos são transmitidos através da amostra, mas isto de fato não acontece. O sistema de detecção colimada com iluminação hemisférica aceitará apenas os raios incidentes que são recíprocos ao padrão de radiação produzida por um feixe incidente colimado. Quando se refere a sistema de espectrofotômetros com rede de difração, a geometria  $d/0^\circ$  oferece mais que o dobro de eficiência radiométrica quando comparado ao sistema  $0^\circ/d$  (LABSPHERE, 2006).

O UV-1000S utiliza uma lâmpada de xenônio pulsada, montada dentro da esfera de integração. A lâmpada fornece energia suficiente para o intervalo espectral de 250 a

450nm. O instrumento utiliza dois espectrógrafos de matriz de fotodiodos. Um espectro completo é obtido usando três pulsos e os dados são processados e mostrados em cinco segundos (LABSPHERE, 2006).

### 7.3.2 O espectrofotômetro fotoacústico

A montagem fotoacústica empregada neste estudo foi composta dos seguintes equipamentos: lâmpada de arco de xenônio (Oriel, mod. 6128, 1000W); modulador mecânico (PAR, mod. 192); monocromador (Oriel, mod 77250); amplificador síncrono (PAR-EG&G, mod. 5210); célula fotoacústica fechada convencional (fabricada no IFGW/ Unicamp); microfone B&K 4179 e um microcomputador para aquisição e processamentos do sinal fotoacústico. A configuração experimental utilizada é mostrada na figura 11.

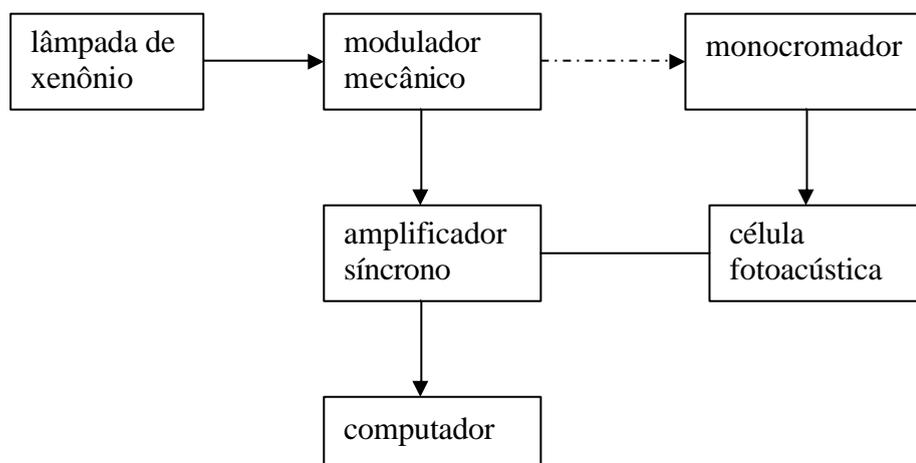


Figura 11. Ilustração esquemática da montagem fotoacústica. Laboratório de Fototérmica e Ressonância Magnética do Instituto de Física *Gleb Wataghin* (IFGW), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O modulador e a célula fotoacústica são conectados ao amplificador síncrono, que é conectado através de uma interface de uso geral a um microcomputador para a aquisição de dados. A constante de tempo típica utilizada é 1s, e fornece o tempo de

resposta da montagem. A frequência de modulação utilizada nas medidas fotoacústicas foi de 17Hz.

A lâmpada de arco xenônio foi utilizada para fornecer radiação no intervalo espectral de 260 a 400nm, que corresponde à maior parte da radiação ultravioleta solar que atravessa a camada de ozônio alcançando a superfície terrestre.

## **7.4 Procedimento experimental**

### **7.4.1 Medidas com espectroscopia de absorção com detector de esfera de integração**

O espectro de absorção do substrato VitroSkin® pré-condicionado na temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $50 \pm 4\%$  foi inicialmente obtido como espectro de referência. Uma micropipeta foi utilizada para dispensar o produto no substrato, previamente cortado, de área circular de  $5\text{cm}^2$ . O protetor solar foi dispensado na forma de várias pequenas gotas sobre o substrato e gentilmente espalhado com o dedo revestido com uma dedeira de látex num movimento circular por aproximadamente 10s até formar uma camada de produto o mais uniforme possível. Deixou-se secar o produto por 15 minutos e após a secagem foi obtido o espectro de absorção. Para cada produto investigado, foram preparadas 4 amostras nas duas concentrações investigadas: 0,8 e 2,0  $\text{mg}/\text{cm}^2$ .

O procedimento acima foi repetido utilizando-se como substrato a placa de PMMA.

### **7.4.2 Medidas com espectroscopia fotoacústica**

Inicialmente foi obtido o espectro fotoacústico do pó de carvão. O carvão pode ser considerado como um perfeito absorvedor da radiação UV; deste modo, seu espectro

de absorção serve para caracterizar o espectro de emissão da lâmpada (ANJOS, 2004). Todos os espectros subseqüentes foram normalizados em relação ao espectro da lâmpada. No experimento com a espectroscopia fotoacústica, devido a restrições dimensionais da célula fotoacústica, apenas o substrato VitroSkin® foi utilizado, aplicando-se procedimento análogo ao anteriormente mencionado. Para cada protetor solar investigado foram preparadas 4 amostras nas duas concentrações investigadas: 0,8 e 2,0 mg/cm<sup>2</sup>.

### 7.4.3 Cálculos

#### 7.4.3.1 Cálculo do FPS a partir das curvas de absorção

Como mencionado anteriormente, o FPS, por definição, é determinado *in vivo* e representa o incremento no tempo de exposição necessário para a indução do eritema. O FPS *in vitro* é calculado conforme a equação 6.1 :

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot dI}{\int_{290nm}^{400nm} E_1 \cdot S_1 \cdot T_1 \cdot dI} \quad (\text{Eq. 7.1})$$

O analisador de transmitância UV Labsphere UV-1000S executa o cálculo conforme a equação 1 diretamente por meio de seu software.

#### 7.4.3.2 Cálculo do FPS a partir das curvas de sinal fotoacústico

Para a determinação do FPS *in vitro* através da técnica fotoacústica, o sinal fotoacústico das amostras foi manipulado através do uso de uma planilha no programa Excel através da implementação de um algoritmo conforme a equação 7.1 acima. Como

forma de se estabelecer um procedimento de calibração da medida, o produto de FPS 30 foi escolhido como referência de calibração. Assim, determinou-se de forma iterativa a constante K para o produto de FPS 30, tomado como padrão de referência, conforme a equação 7.2 abaixo. Esta constante foi então aplicada no cálculo do FPS de todas as curvas obtidas por espectroscopia fotoacústica, individualmente. Note que K é um fator escalar aplicado a todos os comprimentos de onda do espectro de absorção entre 290 e 400nm.

$$FPS = \frac{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} E_1 \cdot S_1 \cdot d\lambda}{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} E_1 \cdot S_1 \cdot 10^{-(a_1 \cdot K)} \cdot d\lambda} \quad (\text{Eq.7.2})$$

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Resultados para a espectroscopia de transmissão com substrato pele sintética VitroSkin<sup>®</sup>

A figura 12 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia de absorção com o equipamento Labsphere UV1000S na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$  de produto aplicado sobre pele sintética VitroSkin<sup>®</sup>.

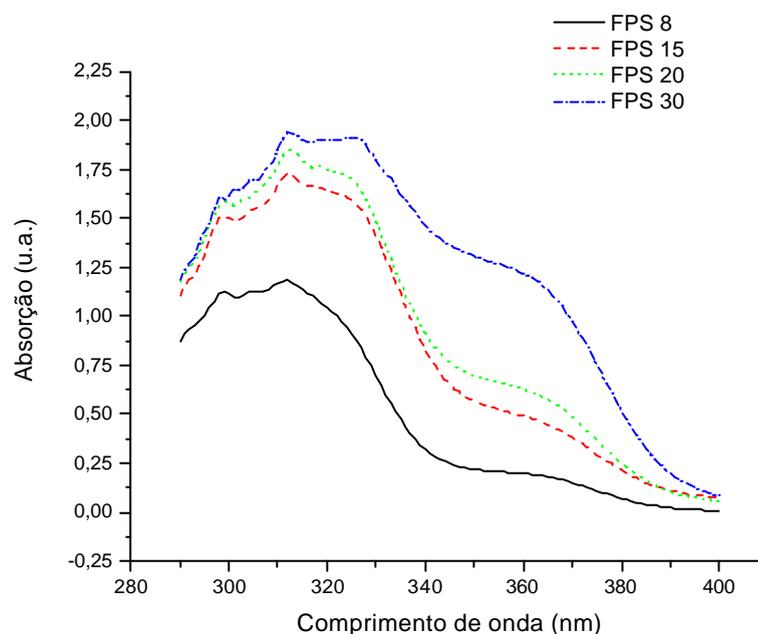


Figura 12. Curva média de absorção para substrato VitroSkin<sup>®</sup> na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$ .

A figura 13 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia de absorção com o equipamento Labsphere UV1000S na concentração de  $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$  de produto aplicado sobre pele sintética VitroSkin<sup>®</sup>.

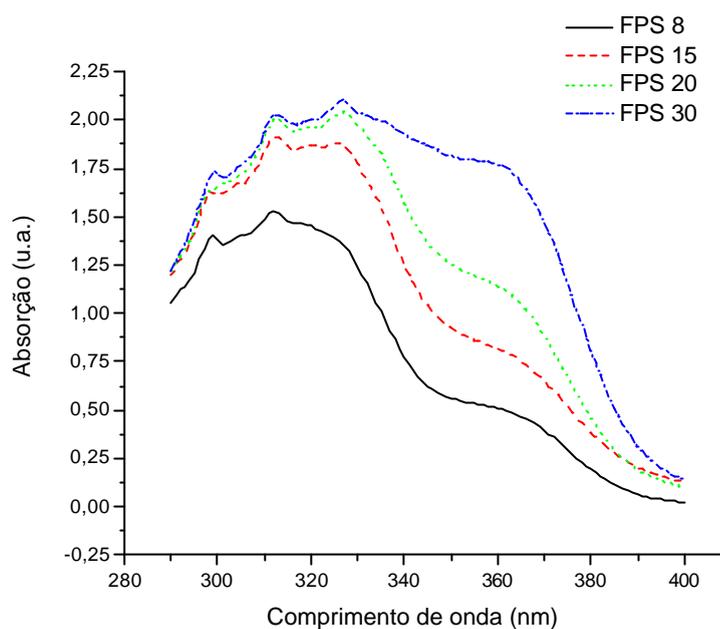


Figura 13. Curva de absorção média para substrato VitroSkin® na concentração de 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

Os FPS determinados a partir das curvas de absorção obtidas foram automaticamente calculados pelo equipamento Labsphere UV1000S conforme equação 7.1.

Os resultados de FPS *in vitro* encontrados para a espectroscopia de absorção utilizando o substrato pele sintética VitroSkin® são apresentados nas tabela 12 abaixo.

Tabela 12. Resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin® nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

| FPS<br>declarado | FPS <i>in vitro</i> (média ± erro padrão) |                        |
|------------------|---|------------------------|
|                  | 0,8 mg/cm <sup>2</sup>                    | 2,0 mg/cm <sup>2</sup> |
| 8                | 8,0 ± 0,1                                 | 15,6 ± 0,5             |
| 15               | 19,1 ± 0,2                                | 30,2 ± 0,2             |
| 20               | 23,1 ± 0,5                                | 37,6 ± 1,5             |
| 30               | 36,3 ± 1,2                                | 50,0 ± 1,4             |

Através da utilização do programa Origin 6.0 foram determinados os dados dos ajustes lineares do FPS *in vitro* versus o FPS declarado em rótulo segundo a equação:

$$\text{FPS}_{IN\ VITRO} = A + B \cdot \text{FPS}_{RÓTULO} \quad (\text{Eq. 8.1})$$

A tabela 13 expressa os dados do ajuste linear encontrados para a espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin<sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

Tabela 13. Ajuste linear para resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin<sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup> versus FPS declarado em rótulo.

| Concentração<br>(mg/cm <sup>2</sup> ) | A     | B    | r <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|-------|------|----------------|
| 0,8                                   | -1,33 | 1,25 | 0,991          |
| 2,0                                   | 5,24  | 1,54 | 0,980          |

## 8.2 Resultados para a espectroscopia de absorção com substrato PMMA.

A figura 14 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia de absorção com o equipamento Labsphere UV1000S na concentração de 0,8mg/cm<sup>2</sup> de produto aplicado sobre substrato PMMA.

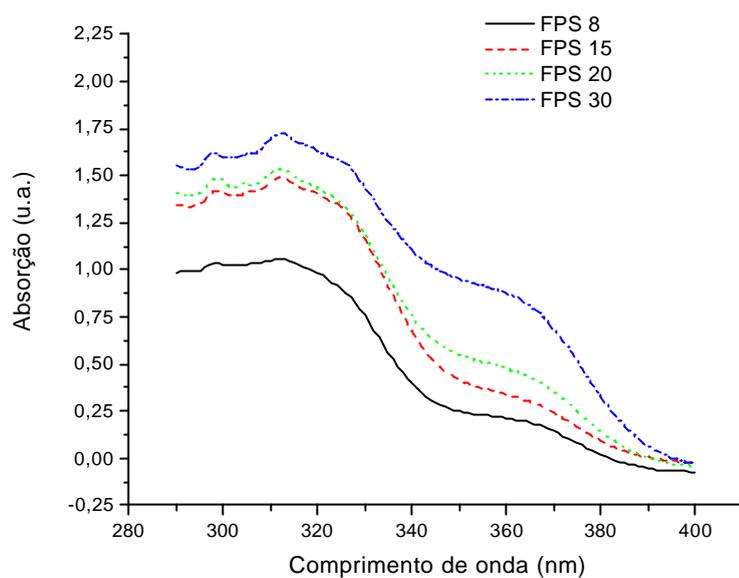


Figura 14. Curva de absorção média para substrato PMMA na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$ .

A figura 15 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia de absorção com o equipamento Labsphere UV1000S na concentração de  $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$  de produto aplicado sobre substrato PMMA.

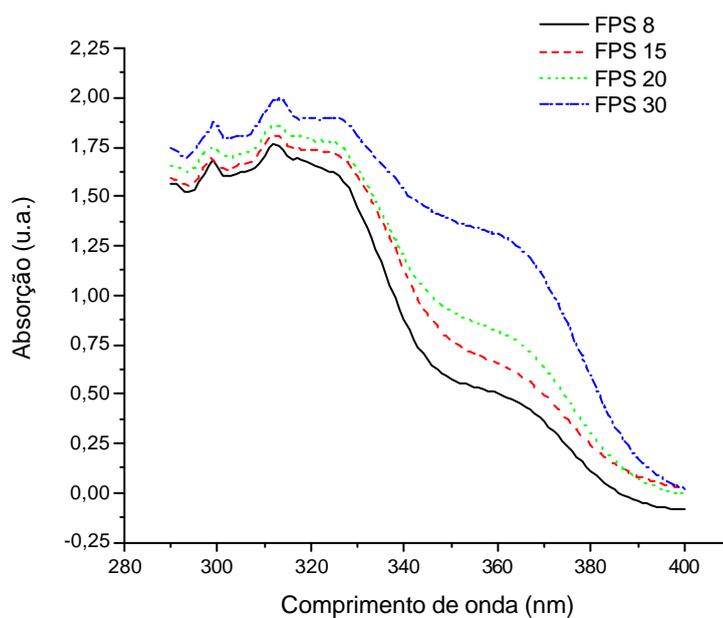


Figura 15. Curva de absorção média para substrato PMMA na concentração de  $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$ .

Os resultados de FPS *in vitro* encontrados para a espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA são apresentados nas tabela 14 abaixo.

Tabela 14. Resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

| FPS<br>declarado | FPS <i>in vitro</i> (média ± erro padrão) |                        |
|------------------|---|------------------------|
|                  | 0,8 mg/cm <sup>2</sup>                    | 2,0 mg/cm <sup>2</sup> |
| 8                | 7,2 ± 0,2                                 | 19,1 ± 0,5             |
| 15               | 13,6 ± 0,5                                | 24,6 ± 0,9             |
| 20               | 15,6 ± 0,4                                | 28,4 ± 0,9             |
| 30               | 25,0 ± 1,2                                | 42,5 ± 1,4             |

A tabela 15 abaixo expressa os dados do ajuste linear do FPS *in vitro* com substrato PMMA por espectroscopia de absorção nas concentrações 0,8mg/cm<sup>2</sup> e 2,0mg/cm<sup>2</sup> *versus* o FPS declarado em rótulo.

Tabela 15. Ajuste linear para resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup> *versus* FPS declarado em rótulo.

| Concentração<br>(mg/cm <sup>2</sup> ) | A    | B    | r <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|------|------|----------------|
| 0,8                                   | 0,86 | 0,79 | 0,988          |
| 2,0                                   | 9,25 | 1,06 | 0,971          |

### 8.3 Resultados para espectroscopia fotoacústica com substrato VitroSkin<sup>®</sup>

A figura 16 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia fotoacústica na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$  de produto aplicado sobre pele sintética VitroSkin<sup>®</sup>.

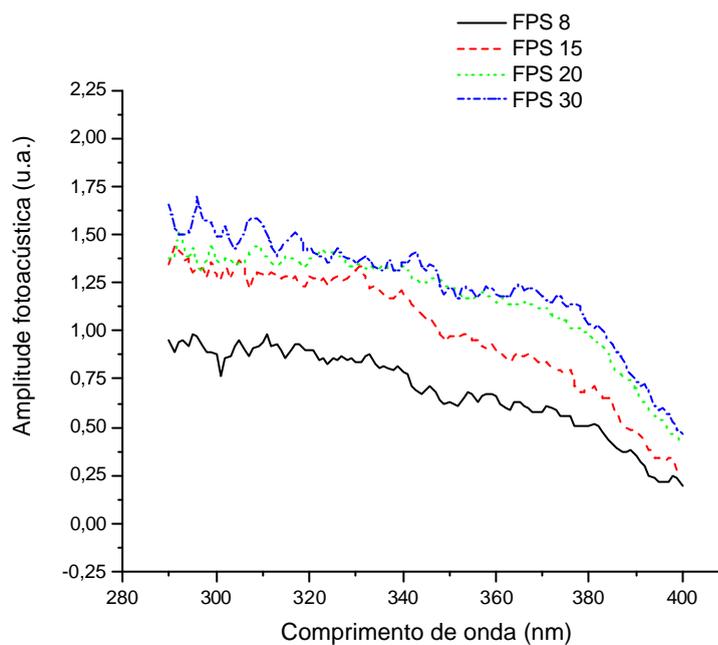


Figura 16. Curva média de sinal fotoacústico para substrato VitroSkin<sup>®</sup> na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$ .

A figura 17 abaixo apresenta as curvas médias de absorção para cada protetor solar avaliado através da espectroscopia fotoacústica na concentração de  $2,0\text{mg}/\text{cm}^2$  de produto aplicado sobre pele sintética VitroSkin<sup>®</sup>.

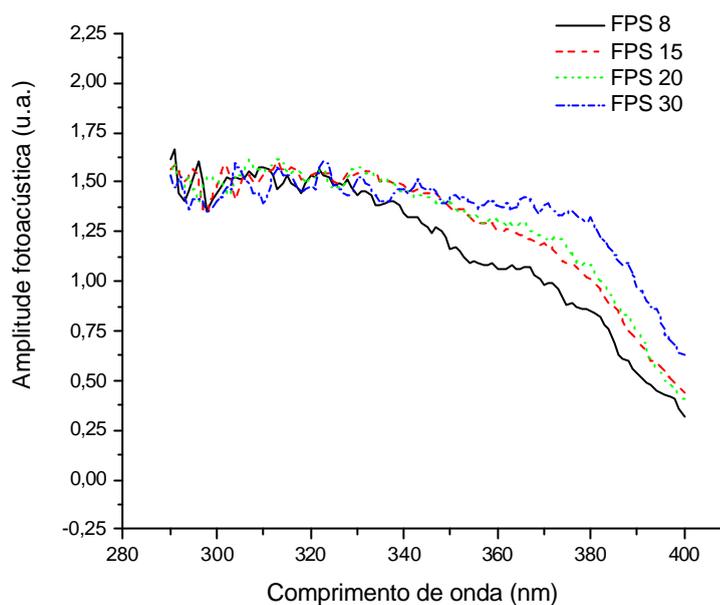


Figura 17. Curva média de sinal fotoacústico para substrato VitroSkin® na concentração de 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

Os FPS determinados a partir das curvas de sinal fotoacústico obtidas foram calculados conforme a equação xx, utilizando-se uma planilha de Excel e procedimento descrito no item 3.4.3.2.

Os resultados de FPS *in vitro* encontrados para a espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato pele sintética VitroSkin® são apresentados nas tabela 16 abaixo.

Tabela 16. Resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato VitroSkin® nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

| FPS<br>declarado | FPS <i>in vitro</i> (média ± erro padrão) |                        |
|------------------|---|------------------------|
|                  | 0,8 mg/cm <sup>2</sup>                    | 2,0 mg/cm <sup>2</sup> |
| 8                | 7,6 ± 0,1                                 | 31,2 ± 2,1             |
| 15               | 19,3 ± 2,5                                | 32,1 ± 1,2             |
| 20               | 23,4 ± 0,3                                | 33,6 ± 2,3             |
| 30               | 30,0 ± 1,8                                | 30,0 ± 0,6             |

A tabela 17 expressa os dados do ajuste linear encontrados para a espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato VitroSkin<sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup>.

Tabela 17. Ajuste linear para resultados de FPS *in vitro* médio determinados por espectroscopia fotoacústica utilizando o substrato VitroSkin<sup>®</sup> nas concentrações de 0,8 e 2,0mg/cm<sup>2</sup> versus FPS declarado em rótulo.

| Concentração<br>(mg/cm <sup>2</sup> ) | A    | B     | r <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|------|-------|----------------|
| 0,8                                   | 1,93 | 0,99  | 0,947          |
| 2,0                                   | 32,5 | -0,04 | 0,054          |

---

## **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Para os produtos avaliados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato VitroSkin® e concentrações do produto de 0,8 mg/cm<sup>2</sup> e 2,0mg/cm<sup>2</sup>, foi verificado através do ajuste linear que a melhor condição de teste foi a concentração de 0,8mg/cm<sup>2</sup>, apresentando uma excelente aderência dos dados à curva ajustada, com R<sup>2</sup> de 0,991.

Para os produtos avaliados por espectroscopia de absorção utilizando o substrato PMMA e concentrações do produto de 0,8 mg/cm<sup>2</sup> e 2,0mg/cm<sup>2</sup>, foi verificado através do ajuste linear que a melhor condição de teste foi aquela que empregou concentração de 0,8mg/cm<sup>2</sup>, apresentando maior correlação entre os dados com R<sup>2</sup> de 0,988.

Um fato importante a ser mencionado é que, dentre os substratos utilizados, o PMMA apresentou menor saturação do sinal na região do UV, evidenciada na condição VitroSkin® entre 290 e 310nm. Esta saturação fica caracterizada no gráfico pela curva acentuadamente ascendente entre 290 e 310nm apresentada na condição VitroSkin®, o que não acontece na condição PMMA.

Com base nas observações apresentadas acima, concluímos que para a espectroscopia de absorção com esfera de integração, a melhor condição de teste foi aquela que empregou o PMMA como substrato e na concentração de aplicação do produto de 0,8mg/cm<sup>2</sup>.

Para os produtos avaliados por espectroscopia fotoacústica com o substrato VitroSkin®, a concentração de 0,8mg/cm<sup>2</sup> apresentou uma ótima correlação entre os dados (R<sup>2</sup> = 0,947; B = 0,99). A condição de teste de 2,0mg/cm<sup>2</sup> não apresentou correlação entre os dados (R<sup>2</sup>= 0,054; B= -0,04), ocorrendo uma forte saturação do sinal na região do UVB (290 a 320nm), que não permite sensibilidade da técnica nesta condição.

Embora a concentração de produto empregada na realização do FPS em humanos seja de 2,0mg/cm<sup>2</sup>, a concentração de produto de 0,8mg/cm<sup>2</sup> foi a que apresentou melhor qualidade da previsão do FPS na metodologia *in vitro*, tanto na

espectroscopia de absorção quanto na fotoacústica. Através da espectroscopia de absorção, verificou-se qualidade óptica superior para o substrato PMMA, enquanto o substrato VitroSkin® levou à saturação do sinal na região UVB.

Até onde temos conhecimento, o presente trabalho é pioneiro no uso da fotoacústica como ferramenta auxiliar na determinação do fator de proteção solar de produtos comercialmente disponíveis. A técnica fotoacústica empregando a pele sintética VitroSkin® como substrato e combinada com a padronização externa, utilizando um dos produtos como referência e na concentração de  $0,8\text{mg}/\text{cm}^2$ , foi a que apresentou a melhor correlação direta com os valores de FPS declarados em rótulo ( $R^2=0,947$ ;  $B=0,99$ ).

Os resultados apresentados constituem uma forte evidência do grande potencial da técnica fotoacústica que, com as adaptações adequadas, poderá contribuir na busca de um método de determinação *in vivo* do FPS, de forma minimamente invasiva, sem a necessidade do emprego das altas doses de radiação UV atualmente empregadas para a indução do eritema. Estudos *in vitro* adicionais via espectroscopia fotoacústica, envolvendo estudos de reprodutibilidade, utilização de padrões internacionais e diferentes tipos de substratos seriam valiosos na consolidação da técnica aqui apresentada. O potencial da técnica poderá ainda ser explorado para inúmeros estudos de grande importância na área de fotoproteção; dentre eles podemos citar: fotoestabilidade de protetores solares, previsão do fator de proteção UVA, substantividade de produto à pele e resistência à água.



## REFERÊNCIAS

ANJOS, F. H. et al. Sunscreen effects in skin analyzed by photoacoustic spectroscopy, **Opt. Diag. Sens. IV.** v.5325, p.143-149, 2004.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução RDC nº 237** - Regulamento Técnico sobre Protetores Solares em Cosméticos, 2002.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry.** Oxford: University Press, 1994.

ATKINS, P; JONES, L. **Chemistry Molecules, Matter and Change,** New York: W. H. Freeman, 1999, p. 268-272.

AUSTRALIAN/NEW ZEALAND STANDARD. AS/NZS 2604:1998 - **Sunscreen Products – Evaluation and Classification** Homebush: Standards Australia ,1998.

BALASUBRAMANIAN, D.; RAO, M. Application of photoacoustics to biology: some specific systems and methods, **Can J. Phys.** v.64, p.1132-1135, 1986.

BARJA, P. R. How can physicists study photosynthesis? History and application of the photoacoustic Technique. **Revista Physicae.** v. 1, p.1-7, 2000.

BERGER, D. Accurate simulation of solar radiation helps speed sunscreen development. Solar Light Company. Disponível em <http://www.solar.com/>. Acessado em 21 jun. 2006.

BOISSY, R. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. **Exp. Dermatol.,** Suppl. 2, p. 5-12, 2003.

BOLOGNIA, J. L. Aging Skin. **The American Journal of Medicine.** v. 98, suppl. 1A, 1995.

BOOTS the Chemist. **The guide to practical measurements of UVA/UVB ratios.** Nottingham: The Boots Co. PLC, 1990.

CÉSARINI, J. P et al. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.** v. 19, p. 182–189, 2003.

CHARDON A.; CRETOIS, I; HOURSEAU, C. Comparative colorimetric follow-up on humans of the tannings induced by cumulative exposures to UVB, UVA and UVB+A radiations.. **Int. J. Cosm Scienc** v.13, p.191-208. 1991.

CHARDON, A.; MOYAL, D.; HOURSEAU, C. **Persistent pigment-darkening response as a method for evaluation of ultraviolet A protection assays, Sunscreens** New York: Marcel Dekker, 1997. p. 559- 582.

CIBA Specialty Chemicals Inc. **Nota Técnica – Skin pigmentation** - Managing skin color with Ciba® TINOSORB® UV absorbers. Suíça, 2004.

CIBA Specialty Chemicals Inc. **Nota Técnica – Tinosorb®**, Fotoproteção com fotoestabilidade. Brasil, 2004.

COLE, C. Review Article - Sunscreen protection in the ultraviolet A region: how to measure the effectiveness. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**. v. 17, p. 2-10, 2001.

COLIPA. Guideline for evaluating sun product water resistance, Brussels: COLIPA Publications, 2004.

COLIPA/JCIA/CTFA-SA. International Sun Protection Factor (SPF) Test Method, Brussels: COLIPA Publications, 2003.

COLIPA Task Force. **Method for the in vitro determination of photostability of sun care products**. S. Forestier: L'Oreal Recherche, 1996.

COLIPA- **The European Cosmetic, Toiletries and Perfumery Association – Recommendation n° 11**, 2002.

CORRÊA, M. P.; DUBUISSON, P.; PLANA-FATTORI A. An overview about ultraviolet index and the skin cancer cases in Brazil; **American Society for Photobiology**. v. 78, p.1, 2003.

CTFA Task Force. **Balancing UVA and UVB protection: proportionality, quantitative measurement of efficacy, and clear communication to consumers**, 2000. Disponível em <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/00/Sep00/090600/c000565.pdf>. Acesso em 04 ago. 2006.

DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **It. J. Cosmet. Sci.** v.16, p. 47-52, 1994.

DIFFEY, B. L. **Sunscreens – development, evaluation and regulatory aspects**. New York. Marcel Dekker Inc., 1998, p.589-609.

DIFFEY, B.L. **The need for sunscreens with broad spectrum protection. Biological Responses to Ultraviolet A Radiation**. Overland Park, KS: Valdenmar Publishing, 1992, p. 321-328.

DIN – Deutsches Institut für Normung - **German Standard DIN 67501**. Experimentelle dermatologische Bewertung des Erythemschutzes von externen Sonnenschutzmitteln für menschliche Haut, 1984.

DIN – Deutsches Institut für Normung - **German Standard DIN 67502**. Characterization of UVA protection of dermal suncare products by measuring the transmittance with regard to the sun protection factor, 2004.

FDA, Department of Health and Human Services, **Sunscreen drug products for over-the-counter human use**. Tentative Final Monograph: Proposed Rule, 21 CFR Part 352 et al, 1993.

FDA, Department of Health and Human Services, **Sunscreen drug products for over-the-counter human use**. Final Monograph: Proposed Rule, 21 CFR Part 352 et al, 1999.

FERRERO, L. et al. Sunscreen in vitro spectroscopy: application to UVA protection assessment and correlation with in vivo persistent pigment darkening. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 24, p.63-70, 2002.

FISHER, G. J. *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, **Arch. Dermatol.** v.138, p.1462-1470, 2002.

GIESE, K et al. Photoacoustic in vivo study of the penetration of sunscreen into human skin. **Can. J. Phys.** v. 64, p.1139-1141, 1986.

HAWK, J.; MCGREGOR, J.. **Family Doctor Skin & Sunlight**. Dorling Kindersley Limited, 2001.

HAYWOOD, R. et al. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: implications for skin aging and melanoma? **The Society for Investigative Dermatology**, v.121, p. 862-868, 2003.

IMS Inc. What is VITRO-SKIN<sup>TM</sup>? Disponível em: <<http://www.ims-usa.com/ittrium/servlet/visit>>. Acesso em 21 jun. 2006.

IMS Inc. *IMS in vitro SPF/UVA protocol for use with VITRO-SKIN<sup>TM</sup> substrate*.; Disponível em <<http://www.ims-usa.com/ittrium/servlet/visit>>. Acesso em 21 jun. 2006.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em <<http://www.inpe.br>>. Acesso em 07 jun. 2006.

JCIA- Japanese Cosmetic Industry Association, **Standard SPF Test Method**, 1991.

JEFFERY, G.H. et al. **Vogel's – Textbook of Quantitative Chemical Analysis**. New York. Longman Scientific & Technical, 1989.

KAIDBED, K.H., BARNES, A., Determination of UVA protection factors by means of immediate pigment darkening in normal skin, **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 25, p. 262-266; 1991.

KEDE, M.P.V; SABATOWICH. **Dermatologia Estética**, São Paulo: Ed Atheneu, 2004.

KIRCHHOFF, V.W.J.H.. **Ozônio e radiação UVB**. São José dos Campos: Transtec Editorial, 1995.

KOLLIAS, N. et al. **The spectroscopic characteristics of cutaneous vascular reactions: UVB induced erythema, occlusion**, Massachusetts :General Hospital, 1991.

KOLLIAS, N.. **Skin structure and functions**. Skillman, 2002.[Publicação interna Johnson & Johnson,]

Labsphere Inc. **SPF Analysis of Sunscreens** - Technical Note. Disponível em <<http://www.labsphere.com/>>. Acesso em 21 jun. 2006.

MATHEUS, L.G.M.; KUREBAYASHI, A. K. **Fotoproteção**. São Paulo, Tecnopress, 2002.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v 195, p. 298– 308, 2004.

McCRACKEN, T.; WALKER, R. **Novo Atlas do Corpo Humano**. New York. Visor, 2001, p. 36-37.

MOYAL, D.; CHARDON, Alain; KOLLIAS, N. Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point. (Part 1). Calibration of the method. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 16, n.6, p.245-249, 2000.

MOYAL, D.; CHARDON, A.; KOLLIAS, N. UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by the persistent pigment darkening (PPD) method (Part 2). **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 16, n.6, p.250-2559, 2000.

OKUNO, E.; VILELA, M.A.C. **Radiação Ultravioleta: Características e Efeitos**. São Paulo: Livraria da Física / Sociedade Brasileira de Física, 2005.

OWEN, T. **Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy – A primer** . Hewlett Packard Company, Palo Alto: 1996, p 12-27.

PUGLIESE, P. T.. **Physiology of the Skin II. An Expanded Scientific Guide for the Skin Care Professional** . New York :Allured Publishing Corporation, 2001.

ROMPE, P.C.B.; ANJOS, F. H.; MANSSANARES, A. M.; AVALOS, D. A.; BARJA, P. R. Characterization of human skin through photoacoustic spectroscopy. **J. Phys. IV** v.125, p. 785-787, 2005.

ROSENCWAIG, A.; GERSHO A. Theory of the photoacoustic effect with solids; **Journal of Applied Physics**. v. 47, n.1, p.64-69, 1976.

SEHN, E. et al. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of sunscreens into human skin in vivo: A statistic treatment. **Review of Scientific Instruments**. v. 74, p.758-760, 2003.

SHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E.. **Skin Barrier Principles of Percutaneous Absorption**. Basel: Karger , 1996, p. 1-42.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1992, p. 561-565.

STOKES, R; DIFFEY, B. In vitro assessment of sunscreen photostability: the effect of radiation source, sunscreen application thickness substrate. **International Journal of Cosmetic Science**. v.21, p.341-351, 1999.

WATCHTOWER – Bible and Tract Society of Pennsylvania. Skin cancer – How to protect yourself. **Awake**. v. 08/06, p. 2-7, 2005.

WESTERDAHL, J. *et al.* Sunscreen Use and Malignant Melanoma. **Int. J. Cancer**. v. 87, p. 145-150, 2000.

WINSTON, R. **Human – The Definitive Visual Guide**. London: Dorling Kindersley Limited, 2004, p. 97-99.