

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA

STEPHANIE DE MOURA ARAÚJO FERNANDES

Metodologias para Avaliação do Fator de Proteção UVA

Orientadores: Prof. Dra. Bianca Aloise Maneira Corrêa
Prof. Dr. Daniel Karl Resende

Rio de Janeiro
2014

STEPHANIE DE MOURA ARAÚJO FERNANDES

Metodologias para Avaliação do Fator de Proteção UVA

Trabalho de conclusão de curso de graduação em ciências farmacêuticas, faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dra. Bianca Aloise Maneira Corrêa
Prof. Dr. Daniel Karl Resende

Rio de Janeiro
2014

Ficha Catalográfica

Fernandes, Stephanie de Moura Araújo

Metodologias para Avaliação do Fator de Proteção UVA

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Prof. Dra. Bianca Aloise Maneira Corrêa Santos
Prof. Dr. Daniel Karl Resende

1. Proteção solar. 2. Filtros solares. 3. UVA I. Corrêa, Bianca Aloise (Orient.).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III.
Metodologias para Avaliação do Fator de Proteção UVA.

Agradecimentos

À Deus pela saúde, pela sabedoria e seu cuidado.

À família pelo apoio nessa longa caminhada.

Aos amigos pelo companherismo.

Aos mestres pelo ensinamentos e dedicação.

À universidade que me ensinou que ninguém chega a lugar algum sozinho.

*Farmacêutico
Sois aquele
Que com colírios alivias os olhos
Dando soluções as doenças
Comprimindo a cura
Drageando e mascarando sabores
Encapsulando a fé
E emulsionando, tu uniste impossivelmente a água e o óleo.*

*Farmacêutico
Sois aquele
Que do sangue
Conseguistes dosar o normal
Contando uma a uma
Células do início da vida
E de excrementos
Que todos rejeitam
Tu descobristes utilidades
Para o diagnóstico*

*Farmacêutico
Vives no mundo obscuro
No mundo da pesquisa
Dedicando-se ao descobrimento de substâncias
Que a humanidade desconhece
Mas tu sabes o prazer da descoberta
E a vitória de um desafio.*

*Farmacêutico
Sois aquele que estais ao lado do leito hospitalar
Como um contra regra da saúde
Obstinado a providenciar o medicamento
Sem o intuito de que, algum dia uma voz caminhe a ti, e diga:
Obrigado, o medicamento que tu adquiristes foi de grande valia.*

*Farmacêutico
Entre posologias
E contra indicações
Continuas enfrentando todas reações adversas
Pois o efeito colateral
É causado por aqueles que não valorizam
Que tu sempre buscas o benefício
Assumindo todos os riscos.*

Autor: Sérgio Luis Gomes da Silva. Jan, 2000

Resumo

O sol emite ondas eletromagnéticas de diferentes comprimentos, incluindo a radiação ultravioleta (UVA), que compreende a faixa de 100 a 400 nm. Esta é subdividida em UVA (320 a 400 nm - faixa de menor energia), UVB (290 a 320 nm) e UVC (200 a 290 nm - faixa de maior energia). As radiações solares produzem efeitos agudos, que incluem a queimadura solar ou eritema e os efeitos crônicos que geram o fotoenvelhecimento e o câncer de pele. As radiações UVA e UVB são capazes de produzir danos ao DNA, seja por absorção direta da radiação nesta região do espectro pelo DNA ou através de danos indiretos, causados pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são capazes de promover a oxidação de diversas biomoléculas. A radiação UVA induz pigmentação da pele promovendo o bronzeamento por meio do escurecimento da melanina proveniente da sua fotooxidação. É a radiação mais abundante na superfície terrestre, seguindo uma proporção de 95% de UVA e 5% de UVB. Com a descoberta de substâncias capazes de prevenir o eritema da pele causado pela radiação solar, ou seja, os filtros solares, iniciou-se o desenvolvimento dos protetores solares. Os filtros solares podem ser de dois tipos, inorgânicos e orgânicos. Os filtros inorgânicos refletem e dispersam a radiação UV e os filtros orgânicos absorvem a energia eletromagnética na faixa do UV emitindo em uma forma de menor energia e menos agressiva. Inicialmente, foram desenvolvidos protetores solares que preveniam o eritema causado pela radiação UVB. Com o conhecimento dos danos causados pela radiação UVA, ficou evidente que a pele precisaria ser protegida em amplo espectro (UVA/UVB), prevenindo assim, tanto os danos diretos, quanto os danos indiretos da radiação UV. Visto que a determinação do fator de proteção solar (FPS) está bem consolidada e determina apenas a proteção da pele contra os raios UVB, é de suma importância que as metodologias para a avaliação do fator de proteção frente aos raios UVA (FPUVA) sejam normalizadas e harmonizadas facilitando assim a compreensão pelos consumidores do nível de FPUVA. Segundo a resolução RDC 30/12 da ANVISA, os protetores solares devem apresentar um FPUVA de no mínimo 1/3 do FPS declarado no rótulo e permite para essa determinação metodologias *in vitro* e *in vivo* preconizadas pela Associação Européia de Cosméticos (COLIPA). O objetivo deste trabalho é descrever e comparar as diferentes metodologias disponíveis para determinação do FPUVA. Foram encontradas inúmeras divergências entre as metodologias preconizadas pelas agências reguladoras, requisitos de proporcionalidade e requisitos de rotulagem dos produtos de proteção solar UVA .

Índice de Figuras

Figura 1 - Camadas da epiderme.

Figura 2 - Níveis de penetração dos diferentes comprimentos de onda na pele.

Figura 3 - Diagrama dos orbitais moleculares envolvidos na absorção UV dos filtros solares orgânicos (Adaptado de FLOR et al., 2007).

Figura 4 - Ilustração esquemática do comprimento de onda crítico.

Figura 5 - Ilustração de voluntário para teste PPD (Adaptado de JCIA, 1995).

Figura 6 - Ilustração comparativa de 2 protetores com mesmo valor de FPS e diferentes valores de FPUVA.

Índice de tabelas

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para regulamentação da determinação FPUVA.

Tabela 2 - Nível de proteção UVA em função do intervalo de comprimento de onda crítico.

Glossário de siglas e abreviações

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARTG - Australian Register of Therapeutic Goods
COLIPA - Associação da Indústria de Cosméticos
CRF - *Federal Register Regulations*
DECS - Descritores em Ciências da Saúde
EMA - *European Medicines Agency*
ERO - Espécie reativa de oxigênio
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
FDA - Food and Drug Administration
FPS - Fator de proteção solar
FPUVA - Fator de proteção solar contra a radiação UVA
FPUVB - Fator de proteção solar contra a radiação UVB
HOMO - orbital molecular preenchido de mais alta energia
JCIA - *Japan Cosmetic Industry Association*
LUMO - orbital molecular vazio de mais baixa energia
IPD - Pigmentação Persistente Imediata (Immediate Pigment Darkening)
ISO - International Organization for Standardization
NICNAS - National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme
OTC - Over-the-Counter
PPD - Pigmentação Persistente (Persistent Pigmentation Darkening)
ROS - Radicais livres
RSF - Radical Skin Factor
TGA - Therapeutic Goods Administration
UV - Ultravioleta
UVR - Radiação ultravioleta
UVA - Radiação ultravioleta A correspondente à faixa de 320nm-400nm
UVB - Radiação ultravioleta B correspondente à faixa de 290nm-320nm
UVC - Radiação ultravioleta C correspondente à faixa de 200nm-290nm

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1. Pele.....	11
1.2. Radiação solar.....	13
1.2.1. Envelhecimento e efeitos da radiação solar na pele.....	14
1.2.2. Efeitos da radiação UVB na pele.....	15
1.2.3. Efeitos da radiação UVA na pele.....	16
1.3. Epidemiologia do câncer de pele.....	16
1.4. Protetores Solares.....	17
1.4.1. Filtros Solares.....	18
1.4.1.1. Filtro solar orgânico.....	18
1.4.1.2. Filtro solar inorgânico.....	20
1.5. Regulamentação dos protetores solares.....	21
2. Justificativa.....	22
3. Objetivo.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.1.1. Objetivos específicos.....	23
4. Metodologias.....	24
5. Resultados e discussão.....	25
5.1. Descrição das metodologias disponíveis para determinação do FPUVA.....	25
5.1.1. Metodologias <i>in vivo</i>	25
5.1.1.1. Persistent Pigment Darkening (PPD).....	25
5.1.1.2. Immediat Pigment Darkening (IPD)	26
5.1.2. Metodologias <i>in vitro</i>	28
5.1.2.1. Razão UVA/UVB ou Boot's Star Rating.....	28
5.1.2.2. Comprimento de ondacrítico.....	28
5.1.2.3. Teste <i>in vitro</i> COLIPA.....	30
5.1.2.4. UVA Balance.....	30
5.1.2.5. Radical Skin Factor(RSF).....	31
5.2. Regulamentação da determinação de FPUVA.....	32
5.2.1. Brasil.....	32
5.2.2. Japão.....	32
5.2.3. União Européia.....	33
5.2.4. Estados Unidos.....	33
5.2.5. Austrália.....	34
5.2.6. Canadá.....	35
5.3. Discussão.....	37
5.3.1. Comparações entre as metodologias discriminadas.....	37
5.3.2. Considerações sobre a razão UVA/UVB.....	39
5.3.3. Requisitos de rotulagem.....	40
6. Conclusão.....	41
7. Referências bibliográficas.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, que corresponde a 16% do peso corpóreo. Esta apresenta inúmeras funções como proteção, nutrição, pigmentação, queratogênese, termorregulação, transpiração, respiração, defesa e absorção (BATISTELA et. al 1999; SANT'ANNA, 2003).

A pele é constituída por duas principais camadas: epiderme e derme (SPENCER, 1991; BOIGLY, 1986).

A epiderme é formada por um epitélio estratificado escamoso queratinizado que, por sua vez, é constituído por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Esta camada é subdividida em camada basal, camada espinhal, camada granulosa e camada córnea (GUIRRO, 2004). Como mostrado na figura 1.

Os queratinócitos, principais células da epiderme, são responsáveis pela produção de queratina, que formam o estrato córneo - a camada mais superficial da epiderme, formado através do processo de queratinização - cuja função é a retenção de água na pele (LEONARDI, 2000).

Os melanócitos são células responsáveis pela síntese de melanina, substância que confere à pele proteção contra os raios solares e é responsável pela coloração dos cabelos, dos olhos e da pele. A formação da melanina ocorre através da transformação da tirosina em dopamina, e da dopamina em dopaquinona, formada pela oxidação da dopamina, fenômeno que pode ocorrer pela luz solar ou por ação enzimática da tirosinase, resultando em dois tipos de melaninas distintas: feomelanina (melanina vermelha) e eumelanina (melanina preta) (PEYREFITTE *et al.*, 1998; Leonardi, 2008).

As células de Langerhans são responsáveis pelo reconhecimento, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T - que permitem a sensibilização dos mesmos (Guirro, 2002; Spencer, 1991).

As células de Merkel apresentam uma terminação nervosa sensitiva, que se liga à fibra nervosa do sistema nervoso central e permite sua sensibilidade tátil (PEYREFITTE et al.,1998).

A camada granulosa é constituída por células poligonais achatadas e nucleadas, que possuem grânulos ricos em precursores de queratina (queratohialina). Esta é considerada a última camada nucleada da epiderme, e se encontra disposta sobre a camada germinativa. É na camada granulosa que se inicia o processo de queratinização (SPENCER, 1991; GUIRRO, 2004).

A camada espinhal é formada por células que possuem o núcleo espesso (com mais queratina que as células basais), atividade mitótica, e se ligam através dos desmossomas - zonas espessas da membrana citoplasmática, (BOIGLY, 1986).

A camada basal é a camada mais profunda da epiderme, constituída por células cilíndricas, as quais fazem contato direto com a derme. Esta camada apresenta intensa atividade mitótica, e é responsável pela formação de novas células, que têm a função de substituir células perdidas da epiderme. É nesta camada que se encontram os melanócitos (Guirro, 2002; Spencer, 1991).

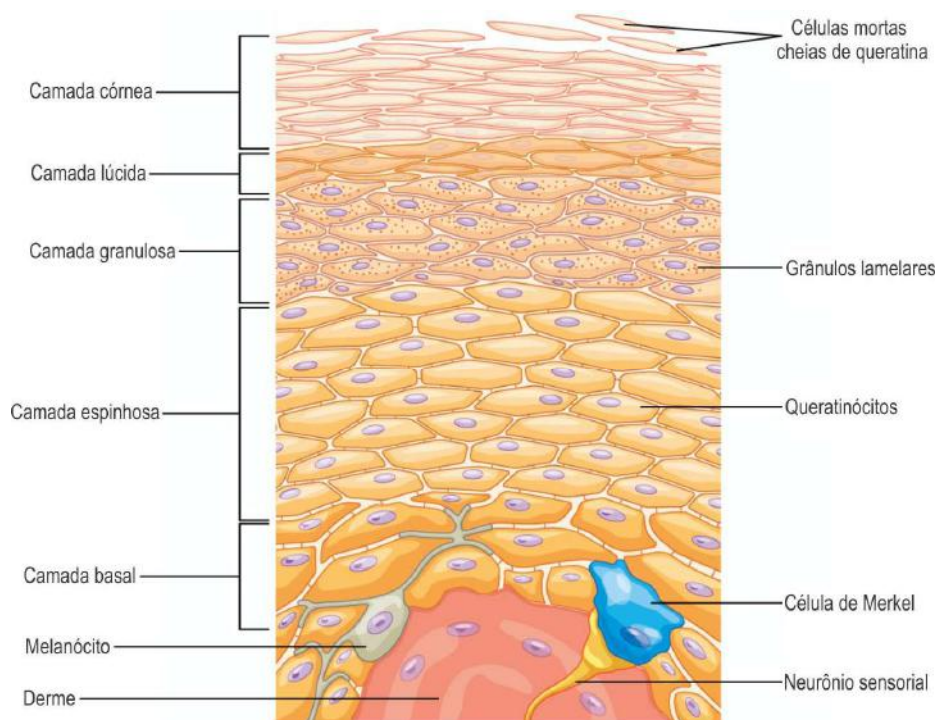


Fig.1 - Camadas da epiderme.

A derme é formada por tecido conjuntivo frouxo, contando com a presença de vasos sanguíneos e terminações nervosas. Esta camada apresenta inúmeras fibras elásticas, reticulares e colágenas, além de possuir diversos tipos de células, como o corpúsculo de Meissner, adipócitos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. Sua composição lhe garante a função de promover flexibilidade para a pele e proteção contra traumas mecânicos. A hipoderme é uma camada subcutânea constituída predominantemente por adipócitos, apresentando função de nutrição e reserva, isolamento elétrico e proteção contra traumas (TORTORA et al., 2006).

1.2. Radiação solar

O sol emite radiações eletromagnéticas, que se subdividem em: radiações ionizantes e não ionizantes, de acordo com a capacidade de promover ionização atômica. A radiação solar, ao atravessar a camada terrestre (estratosfera, camada de ozônio e troposfera) sofre absorção, dispersão e reflexão, amenizando as radiações que atingem a superfície terrestre (EPSTEIN, 1997; ROY *et al*, 1998).

A radiação ionizante é formada pelos raios-X e raios gama. Embora estes tipos de raios não atravessem a camada atmosférica, são capazes de promover danos letais ao organismo, como a quebra da molécula de DNA e a indução do câncer (KIRCHOF;1995).

A radiação não-ionizante é classificada de acordo com seu comprimento de onda (λ), que varia de 100nm a 1700nm e dividida em radiação ultravioleta, luz visível e radiação infravermelha (KIRCHOFF, 1995). A incidência da radiação não-ionizante na terra possui uma proporção de aproximadamente 50% de raios infravermelhos, 5% de raios ultravioleta e 45% de luz visível (ICHIHASHI, 2003; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2000).

A radiação ultravioleta (UV) está contida no intervalo de 200nm a 400nm do espectro eletromagnético. A UV é subdividida de acordo com efeitos biológicos gerados por cada intervalo de comprimento de onda. São estes: radiação ultravioleta C (UVC) (de 200nm a 290nm); radiação ultravioleta B (UVB) (de 290 a 320 nm); radiação ultravioleta A (UVA) (de 320nm a 400nm),

sendo que a radiação UVA ainda se subdivide em UVA I (de 340nm a 400nm) e UVA II (de 320nm a 340nm) (ANVISA, 2012). A radiação UVA é a mais abundante na superfície terrestre, seguindo uma proporção de UVA 95% para UVB 5%(OSTERWALDER; LUTHER; HERZOG, 2000).

A radiação UVC é a radiação de menor comprimento de onda e maior energia. Essa radiação é absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio na estratosfera e, por isso, não atinge a superfície terrestre. A radiação UVB apresenta comprimento de onda intermediário, e atinge a superfície da pele, mais especificamente epiderme. A radiação UVA possui o maior comprimento de onda, (menor energia), e é capaz atingir mais profundamente a pele, ou seja, penetra na derme (OSTERWALDER; LUTHER; HERZOG, 2000; RUVOLO, 1997; STEINER,1995). Abaixo, está representada a figura 2 os diferentes níveis de penetração da radiações solares na pele de acordo com a sua energia.

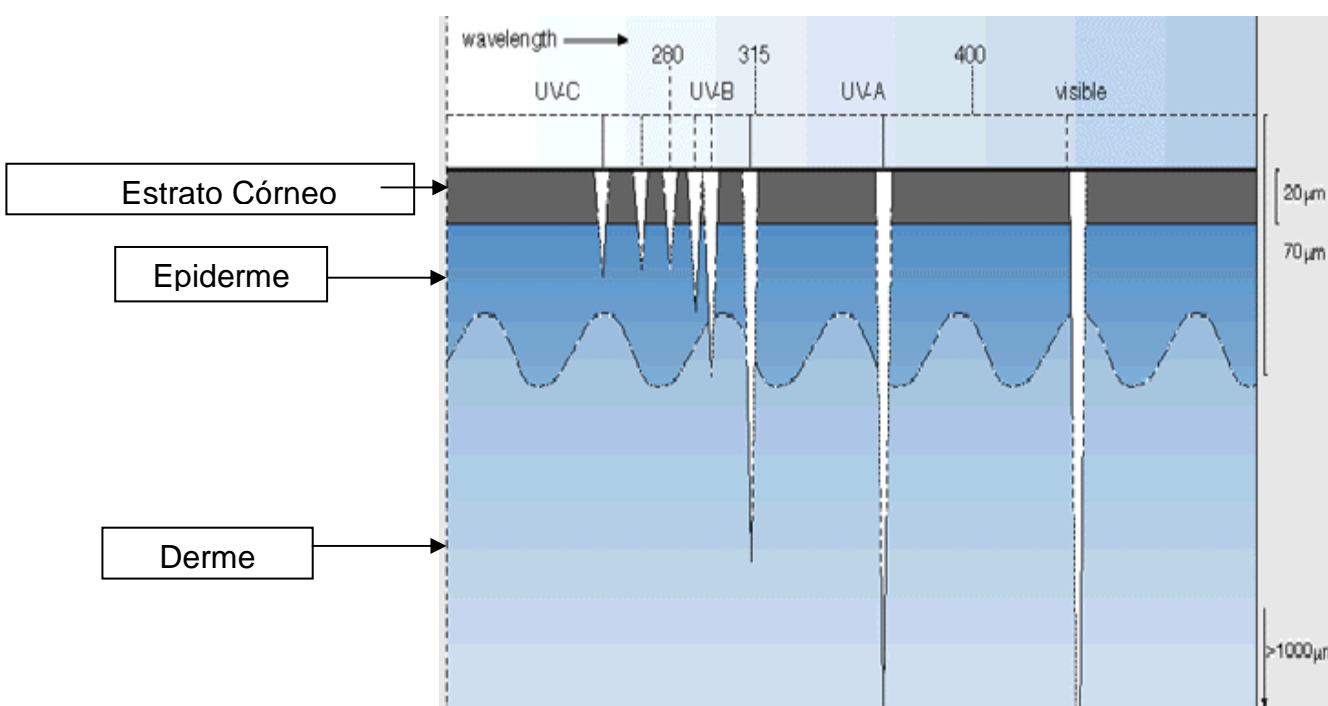


Fig.2 - Níveis de penetração dos diferentes comprimentos de onda na pele.

1.2.1. Envelhecimento e efeitos da radiação solar na pele

O envelhecimento é uma deterioração progressiva do organismo em resposta adaptativa às mudanças que dependem do tempo, sendo caracterizado por alterações em nível celular, que resultam em uma menor capacidade do órgão de executar suas funções normais. (YAAR; GILCHERST, 2002).

O envelhecimento gerado pela ação do tempo é dito envelhecimento intrínseco ou cronológico. O envelhecimento promovido pela exposição aos fatores ambientais (como à radiação ultravioleta) é denominado envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento (PEREIRA, 2008).

A exposição excessiva à radiação ultravioleta, além de provocar fotoenvelhecimento, pode estimular o desenvolvimento do câncer de pele e a imunossupressão. Estes são processos cumulativos que dependem do grau de exposição solar, bem como sua frequência (LUCCI et al.; 2001).

As principais alterações biomoleculares apresentadas no envelhecimento intrínseco da pele são os danos às fibras colágenas. Com o decorrer da idade, ocorre a alteração no metabolismo, juntamente com a uma redução na produção de fibras colágenas e aumento na degradação destas (WIDMER; ZIAJA; GRUNE, 2006). Observa-se também uma atrofia epidérmica devido ao achatamento da camada derme, e a redução progressiva da densidade dos melanócitos e das células de Langerhans (CHUNG, 2004; PUIZINA-IVIC, 2008; HELFRICH; SACHS, 2008).

Os danos produzidos pela radiações UVA e UVB, apesar de ambos contribuírem para o fotoenvelhecimento, apresentam características distintas, devido às diferenças apresentadas entre estas radiações, como o comprimento de onda, energia e capacidade de penetração (WULF et al., 2004).

1.2.2. Efeitos da radiação UVB na pele

A radiação UVB é absorvida na epiderme, afetando predominantemente os queratinócitos. Alguns efeitos imediatos podem ser observados, como a eritema, fotoimunossupressão e hiperplasia epidérmica (DIFFEY, 2004). Em

longo prazo, os raios UVB, por atingirem diretamente o DNA celular e a camada córnea da pele (onde estão presentes as proteínas formadas por aminoácidos aromáticos), promovem a formação de radicais livres (ROS) - como dímeros de ciclobutano e foto-produtos de pirimidinas - que podem gerar lesões cutâneas, levando ao ressecamento e formação de rugas finas e profundas (SVOBODOVA, 2006)

1.2.3. Efeitos da radiação UVA na pele

A radiação UVA é capaz de penetrar nas camadas mais profundas, podendo lesionar os queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme. Embora a radiação UVA possa produzir eritema, é necessária uma quantidade aproximadamente 100 vezes maior que a de radiação UVB para se observar tal lesão (LOWE, 1997).

Os efeitos ocasionados pela radiação UVA são tardios e dependem da intensidade, frequência, e exposição à esta radiação (WULF et al., 2004; LANDAU, 2007; BERNBURG et al., 1999).

O principal efeito produzido pela radiação UVA é indireto, ocasionado pela geração de ROS, os quais atuam na ativação de fatores envolvidos na transcrição do DNA, o que pode resultar em mutações no código genético. Devido a esta característica, a radiação UVA é considerada o principal tipo de radiação responsável por desenvolvimento de câncer de pele (KRUTMANN, 2001; HERNANDEZ-PIGEON, et al. 2007).

São identificadas outras alterações como adelgamento da camada espinhosa, achatamento da derme, alteração na quantidade e distribuição de melanina, e envelhecimentos dos queratinócitos - que se tornam mais resistentes à apoptose - aumentando a probabilidade de mutações no DNA (WULF et al., 2004; LANDAU, 2007; BERNBURG et al., 1999).

A radiação UVA induz uma menor ativação do p53 (fosfoproteína responsável pela manutenção do genoma) em relação à UVB e, conseqüentemente, um menor reparo do DNA, o que aumenta a probabilidade dos dímeros de pirimidina gerarem mutação e danificarem o processo de replicação do DNA (KRUTMAN, 2001; HERNANDEZ-PIGEON et al., 2007).

1.3. Epidemiologia do câncer de pele

A exposição excessiva e crônica ao sol constitui o principal fator de risco para o surgimento do câncer de pele do tipo não-melanoma.

Entre os tumores malignos registrados no Brasil, o câncer de pele não-melanoma é o de maior incidência, correspondendo a 25% dos casos de câncer, e quando detectado precocemente, possui grande possibilidade de cura. Estima-se que, para o ano de 2014, no Brasil, a ocorrência seja de 394.450 novos casos, dos quais 52% são indivíduos do sexo masculino e 48% do sexo feminino (INCA).

1.4. Protetores solares

Protetores solares são produtos cosméticos destinados a proteger a pele contra os efeitos nocivos dos raios solares por meio de substâncias químicas ou físicas (BRASIL, 2004). Estes produtos estão disponíveis em diferentes formulações, como loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões de óleo em água (O/A), emulsões de água em óleo (A/O), bastões, aerossóis, entre outros (BALONG et al. 2010).

O fator de proteção solar (FPS) é uma técnica que determina o grau de proteção oferecida por um protetor solar para as radiações UVB. Este conceito surgiu em 1974, mas apenas no ano de 1978, a agência regulatória norte-americana *Food and Drugs* (FDA) propôs a primeira normatização para a determinação do FPS. O grau de FPS está relacionado com a quantidade e natureza dos filtros solares utilizados na formulação do produto. Quanto maior o valor do FPS, maior será o nível de proteção (EPSTEIN, 1990).

Inicialmente, o uso dos protetores solares estava relacionado apenas à proteção contra os raios UVB, responsáveis pela queimadura solar (dano cutâneo agudo). Com o avanço de estudos relacionados à fotoproteção, observou-se que os danos causados pela radiação solar incluíam também o desenvolvimento de neoplasias cutâneas (fotocarcinogênese) e o

fotoenvelhecimento. Por isso, o protetor solar passou a ser compreendido como um elemento importante na prevenção de danos cutâneos agudos e crônicos causados pela UVR e estendeu-se a necessidade da proteção solar também contra os raios UVA (MASSON; SCOTTI, 2003). Desta forma, atualmente, entende-se que para uma melhor eficiência da proteção solar, a formulação fotoprotetora deve proteger a pele contra os raios UVA e UVB, ou seja, apresentar amplo espectro de proteção.

Um protetor solar eficiente precisa atender alguns parâmetros fundamentais, como apresentar amplo espectro de proteção, possuir filtros ultravioleta com espectro de proteção (UVA e UVB), ter fotoestabilidade, ser capaz de formar um filme homogêneo, e distribuir seus ingredientes de forma regular em toda a superfície cutânea sem penetrá-la, para que não ocorra uma exposição sistêmica às substâncias da formulação (PAOLA; RIBEIRO, 1998), além de não ser irritante, sensibilizante ou foto-tóxico (NOHYNEH; SCHAEFER, 2001).

1.4.1 Filtros solares

Filtros solares são compostos formados por moléculas capazes de proteger a pele contra os efeitos nocivos dos raios solares. Existem duas classes de filtros solares: orgânicos e inorgânicos, cuja classificação é dada de acordo com sua natureza química (DIFFEY; GRICE, 97).

Os filtros orgânicos são constituídos por moléculas capazes de absorver a radiação UV de alta energia, transformá-la em menor energia, e assim torná-la inócua ao ser humano. Quando o filtro solar orgânico é atingido por fóton de alta energia, este passa para um estado excitado, a molécula entra em ressonância e dissipa a energia, retornando ao seu estado fundamental e emitindo outro fóton com menor energia (DIFFEY; GRICE, 97).

Os filtros inorgânicos são formados normalmente por materiais semicondutores com capacidade de absorção e espalhamento da radiação UV que atinge a superfície cutânea, reduzindo a energia que é absorvida pela pele, minimizando assim seus efeitos deletérios (DIFFEY; GRICE, 97).

1.4.1.1. Filtro solar orgânico

São constituídos essencialmente por compostos aromáticos com grupos carboxílicos, os quais apresentam um grupo doador de elétrons, uma amina ou um grupo metoxila na posição orto ou para do anel aromático. O mecanismo de ação se dá pela transição eletrônica entre os orbitais HOMO-LUMO na absorção da radiação UV (HUHEEY; KEITER, 1993; SANTOS FILHOS, 1999).

A teoria de orbitais moleculares (TOM) permite o entendimento da absorção dos filtros solares nos diferentes comprimentos de onda (HUHEEY; KEITER, 1993; SANTOS FILHOS, 1999). Os elétrons situados no orbital π HOMO, orbital molecular preenchido de mais alta energia, são excitados para orbital π^* LUMO, orbital molecular vazio de mais baixa energia. Desta maneira, ao absorverem a radiação UV e ao retornarem para o estado inicial, transformam o excesso de energia em calor (WEBER et al., 2005).

A distância entre os orbitais HOMO e LUMO é correspondente ao comprimento de onda. Distâncias menores entre os orbitais HOMO e LUMO representam uma banda de absorção com comprimentos de onda maiores, isto é, o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia (GILLAM; STERN, 1957).

A adição de espécies doadoras de elétrons, como NH_2 e $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ em anéis aromáticos dos filtros orgânicos, aumenta a possibilidade de ressonância e a estabilidade do anel, com isso a energia dos orbitais ligantes diminui e a dos antiligantes aumenta, elevando assim a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Já a adição de espécies receptoras de elétrons, como COOH e COOR ao anel aromático diminui a estabilidade do sistema. Desta forma, a energia dos orbitais ligantes aumenta e a dos antiligantes diminui, reduzindo a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (GILLAM; STERN, 1957). A figura representa o diagrama de orbitais moleculares, e sua variação de acordo com a adição de espécies doadoras ou receptoras de elétrons.

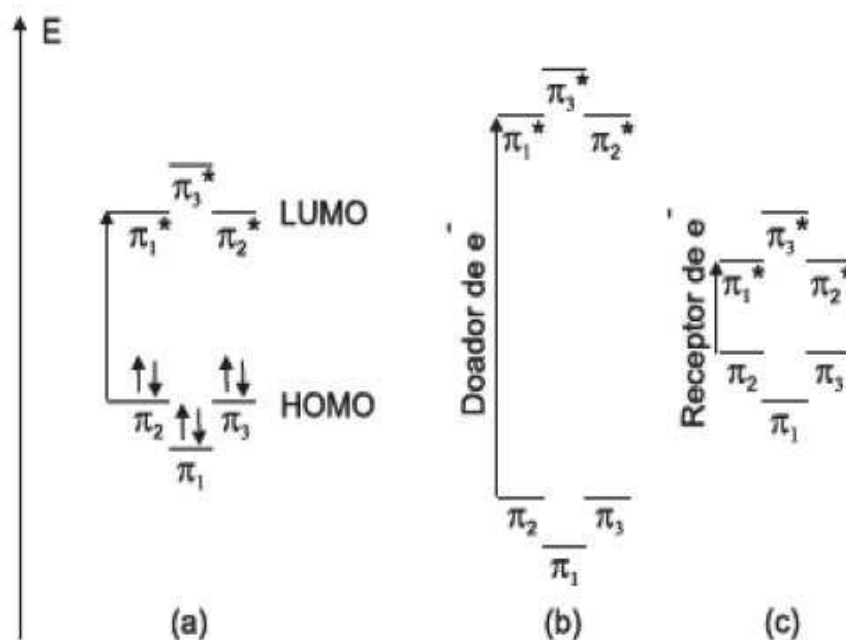


FIG.3- Diagrama dos orbitais moleculares envolvidos na absorção UV dos filtros solares orgânicos (Adaptado de FLOR et al, 2007).

1.4.1.2. Filtro solar inorgânico

Os filtros solares inorgânicos são substâncias capazes de refletir e dispersar as radiações UV através de um filme de partículas, formando uma barreira opaca sobre a pele.

São considerados estáveis, atóxicos, e geralmente são a primeira escolha de fotoprotetores para pacientes com histórico de alergia, pois são considerados clinicamente mais seguros que os filtros orgânicos. Embora possam apresentar algumas desvantagens, como a coloração opaca e esbranquiçada sobre a pele após a aplicação, o aparecimento de comedões e a transferência para vestimenta (PALM; O'DONOGHUE, 2007; GONZALEZ et al, 2007).

O dióxido de titânio e o óxido de zinco são as duas substâncias mais utilizadas para este tipo de filtro solar. Estes propiciam maior proteção frente aos raios solares UVA. Embora sejam oriundos de metais, o dióxido de titânio e

o óxido de zinco possuem propriedades óticas diferentes (CHOS el at,2009; WEBER el at, 2005).

As propriedades apresentadas pelo filtro solar inorgânico irão influenciar na sua eficácia. Cada material possui um tamanho de partícula, com o qual se obtém o máximo de eficiência na difusão. No caso do óxido de zinco, a eficiência máxima de difusão é atingida com partículas de tamanho médio igual a 0,8 μm de diâmetro. Para o dióxido de titânio, o tamanho médio ideal é de 0,25 μm (CHOS el at,2009; WEBER el at, 2005). Outra propriedade importante é o índice de refração, que corresponde à pigmentação esbranquiçada de cada matéria. Quanto maior o índice de refração do filtro solar inorgânico, mais forte é a pigmentação branca, e conseqüentemente, é mais difícil torná-lo transparente em formulações. Normalmente, o dióxido de titânio possui um índice de refração maior que o índice de refração do óxido de zinco (WEBER el at, 2005).

A grande dificuldade da utilização destas substâncias nas formulações de protetores solares é mascarar a tonalidade branca do produto, pois ocorre um depósito deste a sobre a pele, refletindo toda a luz visível. Tal dificuldade é influenciada pelo tamanho das partículas. As partículas mais esbranquiçadas são mais visíveis e difundem a luz com maior eficiência (WEBER el at, 2005).

1.5. Regulamentação dos protetores solares

As agências reguladoras disponibilizam os requisitos mínimos para a regulamentação dos protetores solares, além de fornecerem guias para adequada rotulagem destes produtos, requisitos para a medição do FPS, FPUVA e resistência à água.

A regulamentação dos protetores solares podem variar de acordo com as exigências das agências reguladoras competentes de cada país (KOCKLER el at; 2012).

Nos EUA, Canadá e Austrália, os protetores solares são vendidos e registrados como medicamentos, diferentemente de países como Japão, Brasil e União Européia, onde os protetores solares são registrados como produtos cosméticos.

Apesar das diferenças que os países apresentam nos registros de protetores solares, as metodologias para determinação do grau de proteção contra radiação UVB, a indicação do número de proteção solar e a rotulagem apresentam-se bem harmonizadas (KOCKLER et al.; 2012).

A metodologia FPS é a mais utilizada para determinação da proteção UVB. Esta é um metodologia *in vivo*, e o procedimento requer uso de seres humanos. Os indivíduos participantes dos testes recebem radiação com comprimentos de onda UVB (através de lâmpada UV) na região das costas (JCIA, 2012).

O FPS é calculado pela razão entre o tempo de exposição à radiação UV necessário para produzir eritema na pele protegida pelo protetor solar e esta mesma variável calculada com a pele desprotegida. (JANOUSEK, 1997; ANVISA, 2002).

Com relação à proteção UVA (FPUVA), existem divergências nas metodologias preconizadas para a determinação deste fator, bem como diferentes requisitos para rotulagem dos produtos. As várias divergências encontradas atualmente, seja nos métodos de avaliação do fator FPUVA ou na falta de harmonização dos rótulos, resultam numa dificuldade para o consumidor ao escolher o protetor mais adequado para sua necessidade e seu tipo de pele (KOCKLER et al.; 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Com o conhecimento dos danos causados pela radiação UVA, ficou evidente que a pele precisaria ser protegida em amplo espectro (UVA/UVB), prevenindo assim, tanto danos diretos quanto indiretos da radiação UV.

Visto que a determinação do FPS está bem consolidada e determina apenas a proteção da pele contra os raios UVB, é de suma importância que as metodologias para a avaliação do FPUVA sejam normalizadas e harmonizadas, facilitando assim a compreensão pelos consumidores do nível de FPUVA e promovendo melhoria no monitoramento da eficácia dos protetores solares por agências reguladoras e fabricantes de cosmético.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é descrever e comparar as diferentes metodologias disponíveis para determinação do FPUVA, permitindo reunir informações sobre estas e auxiliando na formulação de propostas para harmonização e normatização do respectivo assunto.

3.2. Objetivos específicos

- Descrever as metodologias de determinação do FPUVA preconizadas pelas agências reguladoras de diferentes países Canadá, Japão, Austrália, Estados Unidos, Europa e Brasil e/ou descritas na literatura.
- Comparar as metodologias preconizadas e disponíveis na literatura e discutir as vantagens e desvantagens das mesmas para a determinação do FPUVA.
- Descrever os requisitos de rotulagem e exigências quanto à proporção entre a proteção frente aos raios UVA e UVB (Razão UVA/UVB) preconizados pelas agências reguladoras desses países.
- Comparar os requisitos de rotulagem e exigências quanto à proporção UVA/UVB e discutir implicações dos mesmos no mercado consumidor.

3. METODOLOGIA

Foram pesquisados artigos referentes à regulamentação dos protetores solares e às metodologias disponíveis para a determinação do fator de proteção FPUVA na base de dados SCOPUS, Portal Capes e SCIRUS e nos sites das agências *Therapeutic Goods Administration (TGA)*, *European Medicines Agency (EMA)*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *Japan Cosmetics Industry Association (JCIA)*, *Health Canada*, *The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association of New Zealand (CTFA)* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antes de ser iniciada a busca nas bases de dados mencionadas, foi realizada a pesquisa pelos termos do vocabulário oficial no DECS (Descritores em Ciências da Saúde) no site "www.bireme.br".

A partir das identificações dos descritores necessários para a revisão: *methodology*, *ultraviolet* e *regulatory*, foi iniciada a pesquisa dos artigos.

Foram selecionados artigos referentes à regulamentação dos protetores solares com ênfase em radiação UVA e artigos que possuam metodologias *in vivo* e *in vitro*, determinadas ou não como metodologias oficiais por algumas das agências regulamentadoras, no intervalo de tempo entre 2000 e 2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Descrição das metodologias disponíveis para determinação do FPUVA

5.1.1. Metodologias *in vivo*

5.1.1.1. Persistent Pigment Darkening (PPD)

Esta metodologia é preconizada pelas agências: ANVISA, JCIA, UE, Canadá.

O teste PPD-FPUVA é realizado em voluntários homens e mulheres saudáveis, que não apresentem tons desiguais de pele, pigmentação, cicatrizes ou com outras irregularidades dentro da área de tratamento, além de não estarem utilizando drogas que contribuam para a fotossensibilidade, como agentes hipotensores, agentes psicotrópicos, tranquilizantes, anti-histamínicos, agentes hipoglicemiantes orais e antibióticos como a tetraciclina. Os voluntários não podem apresentar histórico de câncer de pele, respostas tóxicas ou alérgicas à exposição, ou doenças crônicas da pele, devem possuir idade mínima de 18 anos e pertencer ao grupo com tipo de pele II, III ou IV. As mulheres que queiram se submeter ao teste não podem estar grávidas ou amamentando.

Os tipos de pele são classificados de acordo com a facilidade de apresentarem eritema, e bronzeamento após 30 a 45 minutos da radiação solar. Os tipos de pele aptos para os testes de PPD-FPUVA são:

- Tipo II: sempre queima com facilidade, bronzeada minimamente;
- Tipo III: queima moderadamente, bronzeia gradualmente;
- Tipo IV: queima minimamente, bronzeiam bem.

O local de ensaio para esta metodologia é, geralmente, a parte posterior do corpo. A pele deve ter cor uniforme, quase sem pigmentação. É exigida a reprodução do teste em 10 indivíduos, para que o erro ao medir a FPUVA não exceda 10%(JCIA, 2012).

O teste de PPD requer a preparação de uma amostra padrão, que deve ser realizada simultaneamente com a medição da amostra de teste. A quantidade

de amostra a ser aplicada deve ser igual a $2,0 \text{ mg/ cm}^2$ ou $2,0 \text{ }\mu\text{l/ cm}^2$ em pelo menos 20 cm^2 de pele. Deve-se iniciar a radiação 15 minutos após a aplicação da amostra. Como fonte da radiação, deve ser utilizada luz artificial gama UVA com espectro contínuo semelhante à luz do sol, seguindo uma proporção de 8:20 UVA-I(340-400 nm):UVA-II(320-340 nm), e a dose adequada de UVA corresponde a aproximadamente 15 J/cm^2 . A figura abaixo representa a realização do teste PPD (ISO 24442: 2012).



Fig.5 - Ilustração de voluntário para teste PPD

O valor de FPUVA é obtido a partir de uma equação usando MPPD. O MPPD é definido como a dose mínima de raios UVA que produzem um ligeiro escurecimento dentro de 2 a 4 horas após a exposição. Sabendo-se isto, dá-se o valor de FPUVA, que corresponde à razão entre MPPD na pele protegida e MPPD na pele desprotegida (JCIA, 2012).

O FPUVA de uma amostra teste é definida como a média aritmética dos valores de FPUVA de cada uma das pessoas testadas. De acordo com a persistência da pigmentação, cada área recebe uma classificação, o grau de proteção UVA (FPUVA), dividido em quatro níveis: (JCIA, 2012).

- nenhuma pigmentação, classificada como zero
- pigmentação pouco perceptível (+/-)
- pigmentação média, com duração com mais de duas horas(+);
- pigmentação pronunciada, com duração de mais que duas horas (++)

Os resultados também podem ser dados conforme uma proporção entre MPPD na pele protegida e MPPD na pele desprotegida. Esta proporção enquadra os resultados em: (JCIA, 2012).

- PA+, indicando algum efeito protetor UVA (proporção 2:4)
- PA++, indicando um efeito protetor UVA moderado (proporção 4:8)
- PA+++, indicando um efeito protetor UVA bom (proporção 0:8)
- PA++++, indicando um efeito protetor UVA alto (proporção maior que 16)

5.1.1.2. Immediat Pigment Darkening (IPD)

Esta metodologia está disponível na literatura e não é preconizada por nenhuma das agências investigadas.

O IPD (*Immediat Pigment Darkening*) envolve a observação do escurecimento e bronzeamento transitório da pele. Nesta metodologia, também são utilizados dez voluntários com a pele tipo II, III e IV, com os mesmos requisitos de seleção que dos voluntários para PPD. No IPD, é exigida uma dose de UVA de 1 a 6 J/cm², e em doses acima de 4 J/cm², a curva "absorvância-comprimento de onda" possui aspecto linear. A dose mínima para indução de IPD (MIPDD) varia de acordo com o fototipo, que promove escurecimento da pele, efeito que desaparece entre 1 a 15 minutos depois (ROUTABOUL C, DENIS A, VINCHEI A; 1999).

5.1.2. Metodologias *in vitro*

5.1.2.1. Razão UVA/UVB ou Boot's Star Rating

Esta metodologia está disponível na literatura e não é preconizada por nenhuma das agências investigadas. Este método baseia-se na medida de absorção de um produto teste na faixa de 290 nm - 400 nm, e realiza-se o cálculo da razão entre as áreas sob a curva UVA (320 nm- 400 nm) e UVB (290nm- 320 nm). O procedimento *Boot's Star Rating* consiste na aplicação de uma camada com espessura de 1,0 mg/cm² do produto teste numa placa de polimetilmetacrilato (PMMA). São tomados, em média, 30 pontos ao longo da

área da placa e, em seguida, espalha-se uniformemente o produto teste. É aplicada, à placa, um feixe de luz de $17,5 \text{ J/cm}^2$, gerado por um simulador solar. São feitas medições dentro do intervalo de $290\text{nm} - 400\text{nm}$, tomando-se pontos a cada 2 nm . A razão entre UVA/UVB é calculada antes e depois das irradiações (ENGLAND, 2004).

A razão das curvas UVA/UVB é determinada e associada com a proteção contra radiação UVA (os resultados podem ser expressos em porcentagem). Com a transmitância espectral medida (T_λ), pode-se encontrar o valor de absorbância espectral (A_λ), onde $A_\lambda = -\log(T_\lambda)$. Com esta variável e os valores de absorção dos produtos, torna-se simples determinar a razão UVA/UVB, de acordo com a expressão abaixo: (ENGLAND, 2004).

$$\frac{aUVA}{aUVB} = \frac{\int_{320nm}^{400nm} A_\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290nm}^{320nm} A_\lambda \cdot d\lambda}$$

5.1.2.2. Comprimento de onda crítico

O comprimento de onda crítico é um teste preconizado pela FDA, e este método baseia-se na determinação do espectro de absorbância de um produto no intervalo de 290 nm a 400 nm . O comprimento de onda crítico (λ_c) é aquele que corresponde a, no mínimo, 90% ou mais da curva integral de absorção entre os referidos comprimentos de onda. Os protetores solares com o λ_c maior que 370 nm apresentam proteção contra as radiações UVA, e quanto maior o valor de comprimento de onda crítico, maior será a proteção contra a radiação UVA (FDA, 2012).

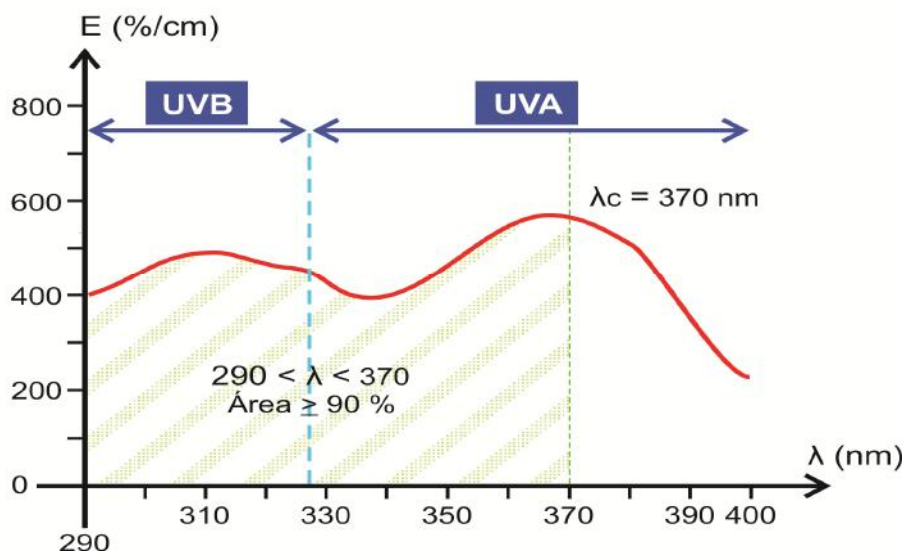


Fig. 4 – Ilustração esquemática do comprimento de onda crítico.

O intervalo de comprimento de onda crítico permite uma relação com o nível de proteção e a razão UVA/ UVB. O comprimento de onda crítico superior a 340 nm e menor que 370 nm corresponde a uma proteção intermediária UVA/UVB; comprimento de onda crítico maior que 370 nm corresponde uma maior proteção UVA/UVB (ENGLAND, 2004).

Abaixo, observa-se a tabela com o nível de proteção UVA em função do intervalo de comprimento de onda crítico.

Tabela 2 – Relação entre λ_c e o nível de proteção UVA

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

5.1.2.3. Teste *in vitro* COLIPA

O teste *in vitro* COLIPA é preconizado pelas agências ANVISA, UE, TGA, Canadá. Este método consiste na medição da transmitância de uma amostra

na região do ultravioleta através da aplicação de uma fina película de protetor solar sobre placas com superfície enrugada, que simulam a microvilosidade da pele. Os resultados obtidos nesta análise não correspondem aos resultados obtidos *in vivo*. Logo, este método necessita de um ajuste na curva espectrofotométrica através de um fator de correção (C), até que o valor de FPS *in vitro* seja igual ao FPS obtido *in vivo*. A partir deste resultado, calcula-se o valor do PPD *in vitro* inicial, o (PPD₀). A amostra, ainda aplicada na placa, é então exposta a uma dose de radiação proporcional a 1,2 J/cm² multiplicada pelo valor de PPD *in vitro* inicial. Finalmente, registra-se mais um espectro de absorção na região do ultravioleta, aplica-se novamente o fator de correção (C) e, com base nessa curva (exposta e ajustada), calcula-se o PPD *in vitro* final (PPD_f). O fator de proteção UVA final é calculado da seguinte forma:

$$\text{Proteção UVA (FP-A)} = \frac{\text{FPS } in vitro}{\text{PPD}_f}$$

O FPUVA (FP-A) do produto é calculado a partir da média dos FPUVA de, no mínimo, três placas individuais. Se o coeficiente de variação entre os valores das placas excederem 20%, placas adicionais devem ser incluídas nas medidas, até que este coeficiente seja atingido.

5.1.2.4. UVA Balance

Disponível na literatura, UVA Balance e não é preconizado por nenhuma das agências investigadas. Este método exige a utilização de ensaios *in vivo* e *in vitro* para a medida relativa da proteção UVA de protetores solares. O resultado é obtido pela relação entre a proteção UVA, PPD *in vitro* e *in vivo*, através da equação:

$$\text{UVA Balance} = \frac{(\text{PPD } in vitro - 1)}{(\text{PPD } in vivo - 1)} * 100$$

na qual o valor do PPD *in vitro* é obtido através da curva espectrofotométrica do protetor solar. Já o FPS é determinado pela metodologia *in vitro*, e comparado com a medição *in vivo*. O resultados dos valores de FPS *in vitro* e *in vivo* devem ser iguais e, caso diverjam, deve-se ajustar a curva de absorção por uma constante (C), para que os resultados se igualem. Em seguida, a curva ajustada resultante é utilizada para calcular o valor do PPD *in vitro*. Este método fornece o resultado percentual em relação à UVA/UVB.

5.1.1.3. Radical Skin Factor (RSF)

Esta metodologia está disponível na literatura e não é preconizada por nenhuma das agências investigadas.

RSF é um fator que caracteriza a proteção de um filtro solar contra a geração de radicais livres, e é obtido através da razão entre o número de radicais livres gerados na pele desprotegida pelo número de radicais livres gerados na a pele protegida, sob condições de irradiação com a mesma dose, radiação UV constante e tempo de radiação variável (U. OSTERWALDER el. At.; 200).

RSF é uma metodologia *in vivo*, realizada através da biópsia da pele de animais (suínos). Esta metodologia inicia-se com a radiação da luz UVA incidindo na pele - dando origem aos radicais livres ($O_2 \cdot$, $\cdot OH$). A detecção de radicais livres é realizada com a espectroscopia ESR (Electron Spin Resonance). Os radicais livres com vida curta precisam de uma substância indicadora denominada 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine - N - oxilo (APC), que reage com estes, permitindo que ocorra o acúmulo e quantificação destes radicais. O princípio da determinação RSF é quantificar a intensidade de sinal da substância APC (U. OSTERWALDER el. At.; 2009).

O cálculo final do RSF é realizado por meio da análise dos dados da pele tratada e não tratada. Os produtos que têm um efeito protetor na geração de

radicais livres possuem $RSF > 1$, já os contidos no intervalo de $0 < RSF < 1$ não possuem proteção contra radicais livres (U. OSTERWALDER et. At.; 2009).

5.2. Regulamentação da determinação do FPUVA

Foram descritas e comparadas as metodologias para determinação do FPUVA e os requisitos de rotulagem preconizados pelos órgãos regulatórios de diferentes países. As regulamentações para os protetores solares variam de acordo com as exigências das agências regulamentadoras de cada país, podendo diferir em rotulagem e metodologias de determinação do nível de proteção frente aos raios UVA.

5.2.1. Brasil

No Brasil, os protetores solares são considerados cosméticos, regulamentado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que aprova o regulamento técnico do MERCOSUL sobre protetores solares - a RDC N° 30 de 1º de junho de 2012.

As metodologias recomendadas para a determinação do nível de proteção UVA incluem metodologias *in vivo* e *in vitro*. Método *in vivo*: *Persistent Pigment Darkening* (PPD). Método *in vitro*: determinação proteção UVA e comprimento de onda crítica- COLIPA.

Os protetores solares com amplo espectro de proteção devem apresentar um FPUVA de, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem e possuir o comprimento de onda crítico mínimo de 370 nm.

5.2.2. Japão

No Japão, os protetores solares são considerados cosméticos, regulamentados pela *Japan Cosmetic Industry Association* (JCIA), que

preconiza o método *Persistent Pigment Darkening* (PPD) para a determinação do fator de proteção UVA. O resultado deste método deve ser representado no rótulo por estrelas, cuja quantidade pode variar de uma a quatro - aumentando juntamente com o nível da proteção UVA.

5.2.3. União Européia

Em toda a Europa, os protetores solares são registrados como produtos cosméticos, sendo regulamentados pela *Cosmetics Europe*, conhecida anteriormente como COLIPA (Associação da Indústria de Cosméticos).

Para a avaliação da proteção contra a radiação UVA, são preconizadas as seguintes metodologias:

EN ISO 2443: 2012, metodologia *in vitro* utilizada para a determinação da proteção UVA e comprimento de onda crítico, e é uma metodologia substituinte do teste UVA *in vitro* COLIPA;

EN ISO 2442: 2011, metodologia *in vivo* utilizada para a determinação da proteção UVA, que substitui o "Pigmentação Persistente" ou PPD, do inglês "*Persistent Pigment Darkening*"

Segundo a *Cosmetics Europe*, dentre essas metodologias, deve-se dar preferência ao método de ensaio *in vitro*, e evitar a necessidade de ensaios *in vivo*.

A proteção UVA de um produto deve apresentar uma relação com seu FPS. O protetor solar obediente às normas deve apresentar esta relação numa proporção igual a 1:3 (UVA:FPS), assim como a proteção no comprimento de onda crítico igual ou superior a 370 nm. Os produtos que respeitam estes requisitos devem exibir, em seu rótulo, a sigla "UVA" dentro de um círculo cujo diâmetro não deve exceder a altura do número FPS.

5.2.4. Estados Unidos

Nos EUA, os protetores solares são regulamentados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e registrados como medicamentos de venda livre (OTC,

do inglês *Over-the-Counter*). A FDA disponibiliza o guia 21 CRF (do inglês *Federal Register Regulations*), que dispõe dos requisitos para rotulagem e testes de eficácia necessários para a aprovação do registro dos protetores solares.

A FDA preconiza, para a determinação do nível de proteção UVA, o método de determinação do comprimento de onda crítico. Ao ser aprovado no teste comprimento de onda crítico, o produto comprovadamente garante boa proteção UVA, que é proporcional à sua proteção UVB.

Os produtos aprovados para proteção UVA devem apresentar, em seu rótulo, o valor numérico do FPS seguido do termo "amplo espectro", sem necessidade de qualquer referência quantitativa da proteção UVA.

5.2.5. Austrália

Na Austrália, protetores solares são regulamentados pela *Therapeutic Goods Administration* (TGA) e são registrados como medicamentos de venda livre (OTC). Os protetores solares são classificados em dois tipos, de acordo com sua principal função: protetor solar terapêutico - é usado com o principal objetivo de proteger o corpo contra a radiação UV da luz solar e deve ser incluído no *Registo Australiano de Therapeutic Goods* (ARTG) - e protetor solar cosmético - produto que possui alguma substância com função de filtro solar, porém, sua principal função não é terapêutica, e nem de proteção solar. O protetor solar cosmético é regulamentado como cosmético pela *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme* (NICNAS).

A Austrália, junto com a Nova Zelândia, desenvolveu a norma AS/NZS 2604:2012, a qual informa os requisitos necessários para a validação do fator de proteção de longo espectro. Esta norma adota, como procedimento padrão, o teste *in vitro* - ISO 24443:2012.

A norma AS/NZS 2604:2012 determina que o grau de proteção contra UVA deve ser proporcional à proteção FPS, devem seguir a proporção de 1:3. Os produtos que garantem proteção UVA, devem fornecer a informação de amplo espectro no rótulo.

5.2.6. Canadá

No Canadá, o protetor solar é registrado como medicamento e deve atender aos requisitos estabelecidos na Canada's Food and Drugs. A agência pública de saúde do Canadá disponibiliza a monografia intitulada como “Documento de Orientação para Protetor Solar”. Esta estabelece as metodologias requeridas para a determinação da proteção contra a radiação UVA e os requisitos para rotulagem.

Um protetor solar eficaz deve proteger tanto contra a radiação UVB, quanto contra radiação UVA, assegurando a proteção em amplo espectro. Assim como na Europa, as proteções UVA e UVB devem seguir a proporção de 1:3, além de garantir a proteção na região do comprimento de onda crítico - de pelo menos 370 nm.

O grau de proteção UVA, o comprimento de onda crítico e a proporção entre o fator de proteção UVA:UVB podem ser calculados através da realização de métodos padronizados.

Os métodos para determinação do comprimento de onda crítico são: Teste UVA *in vitro* COLIPA e FDA- Guia 21 CRF- FDA.

Para a determinação da magnitude da proteção UVA, são preconizadas as seguintes metodologias: ISSO 24442: 2009 e PPD-JCIA, sendo ainda requerido o teste UVA *in vitro* COLIPA para a determinação da proporção entre as proteções UVA e UVB.

Tabela 1 - resumo dos requisitos para regulamentação da determinação FPUVA

Países	Regulamentação	Metodologia preconizada para determinação UVA-FP	Proporção entre UVA:UVB	Rotulagem
Brasil	Cosmético	JCIA- PPD / teste UVA <i>in vitro</i> COLIPA	Proteção UVA deve representar 1/3 do FPS	Facultativo
Japão	Cosmético	JCIA- PPD		UVAFP ++++
UE	Cosmético	ISO 2443:2012/ teste UVA <i>in vitro</i> COLIPA ISO2442:2011 / PPD- JCIA	UVA que seja na proporção 1/3 do FPS	"UVA" dentro de um círculo
FDA	Medicamentos de venda Livre	Teste de comprimento de onda crítico	UVA/FPS devem ser proporcional	FPS "amplo espectro"
TGA	Medicamentos de venda Livre/ Cosmético	ISO 24443:2012	Proteção UVA deve representar 1/3 do FPS	FPS "amplo espectro"
Canadá	Medicamentos de venda Livre	Teste UVA <i>in vitro</i> COLIPA/ CRF 21 ISO 24442: 2011/ PPD-JCIA	Proteção UVA deve representar 1/3 do FPS	FPS "amplo espectro"

5.3. Discussão

5.3.1. Comparações entre as metodologias discriminadas

Analisando os resultados encontrados, foram feitas comparações entre as metodologias *in vivo* e *in vitro*.

As metodologias *in vivo* - PPD e IPD - são procedimentos que envolvem seleção de voluntários, acompanhamento de técnicos especializados, médicos e equipamentos calibrados de alto custo. Devido às altas despesas, estes testes são realizados apenas na fase final do desenvolvimento de formulações.

A seleção de voluntários é uma grande problemática nestas metodologias, pois a determinação da reação é muito difícil para peles escuras. Devido a isto, foram padronizadas seleções de pele do tipo II, III e IV - pele sensível, normal e minimamente sensível, respectivamente - segundo Fitzpatrick (1975). Nestas, não são encontradas diferenças significativas entre os valores do FPUVA, e todas exigem a não utilização de drogas sensibilizantes, que incluem: agentes hipotensores, agentes psicotrópicos, tranquilizantes, anti-histamínicos, agentes hipoglicemiantes orais e antibióticos de tetraciclina.

As metodologias PPD e IPD levam em conta a fotodegradação e referem-se a um efeito biológico, além da obtenção do valor FPUVA de um produto, fornecendo informações sobre a magnitude da proteção prevista na porção do espectro UVA, independentemente dos valores de FPS. O FPUVA é uma média aritmética de todos os valores FPUVA individuais (PFUVA_i) válidos obtidos para todos os indivíduos no teste. (ROUTABOUL & DENIS, 1999). A principal diferença apresentada entre as metodologias PPD e IPD é a energia aplicada em cada método, usando o valor de 1 a 6 J/cm² para o IPD e 15 J/cm² para PPD, considerando que os danos provocados pela radiação UVA podem ocorrer após uma exposição aguda ou repetida de uma dose de UVA inferior a 15 J/cm².

A utilização de uma menor energia de radiação implica em uma menor possibilidade da ocorrência de danos provocados por esta radiação, que é um ponto positivo para metodologia IPD em relação à PPD. Embora aconteça o

rápido desaparecimento do escurecimento da pele, determina-se que a metodologia IPD seja utilizada logo após o término da aplicação da radiação, a fim de que se faça a análise dos efeitos na pele, e isto pode ser considerado uma desvantagem em relação à metodologia PPD, pois caso haja alguma demora na análise dos efeitos na pele, os resultados poderão ser obtidos de forma errada.

Embora somente a metodologia PPD seja aprovada como metodologia oficial, a metodologia IPD também apresenta valor científico.

É difícil determinar qual é a melhor metodologia. Embora somente o PPD seja preconizado pelas agências e seja uma das principais metodologias utilizadas, ambas possuem vantagens e desvantagens, o que torna a determinação da melhor metodologia algo relativo, de acordo com as necessidades e possibilidades do realizador do experimento.

As metodologias *in vitro* são normalmente questionadas devido à falta de correlação com resultados obtidos em humanos e à falta de reprodutibilidade.

O método de avaliação do comprimento de onda crítico (λ_c) é considerado uma metodologia simples, precisa e barata, onde determina-se o primeiro valor em que a razão R é considerada maior ou igual a 0,9. Quanto maior a razão UVA/UVB (R), maior será a proteção com relação à radiação UVA. No entanto, o comprimento de onda crítico não está vinculado com qualquer espectro de ação biológica, não leva em consideração a intensidade de todo o espectro, e sim, fornece informações do nível de absorção da região UVA em relação à UVB, o que possibilita que filtros com proteções diferentes, possam apresentar mesmo valor de λ_c . Uma outra deficiência deste método é análise do FPUVA de formulações contendo filtros inorgânicos por espectrofotometria, pois esta metodologia pode gerar resultados impróprios, devido à refração apresentada pelo filtros inorgânicos, o que implica na necessidade de um equipamento diferenciado, como Labsphere® que realiza a análise do λ_c por transmitância difusa. Esse equipamento atende as exigências regulatórias da COLIPA, FDA e outros.

Assim como o comprimento de onda crítico, o método UVA/UVB ou *Boot's Star Rating* também é um método relativo, ou seja, apresenta informações sobre uma região do ultravioleta em relação a outra. Isto significa

que dois produtos com o mesmo resultado não necessariamente terão o mesmo perfil espectrofotométrico.

O teste UVA Balance possui boa correlação com os valores obtidos *in vivo*, possui reprodutibilidade, é aplicável em todos os tipos de produtos para proteção solar, em todos os sistemas de filtros UV e possibilita a diferenciação entre protetores solares, mas não leva em consideração a fotoestabilidade do filtro (ou sistema de filtros). Este método fornece um resultado em porcentagem (relação UVA/UVB), entretanto o mesmo especifica como expressar os resultados na rotulagem dos produtos.

A metodologia RSF permite uma boa análise biológica dos níveis de radicais livres, uma vez que os radicais livres são moléculas responsivas quando estimuladas pela radiação UVA, o que torna esta metodologia muito peculiar, uma vez que estes resultados não são obtidos em nenhum dos outros testes. Contudo, esse método possui uma grande desvantagem em relação aos outros, que é utilização de suínos para a realização biopsia, o que leva ao embate sobre a utilização de animais em pesquisas.

5.3.2. Considerações sobre a razão UVA/UVB

A ideia de fixar uma proporção 1:3 de UVA para UVB foi bem recebida, visto que a maioria das agências regulamentadoras a adotaram. Entre as agências pesquisadas no presente trabalho, apenas a FDA não recomenda essa proporção.

A determinação da relação 1:3 para radiações UVA:UVB foi baseada em descobertas científicas que demonstram que algumas lesões biológicas na pele podem ser prevenidas e/ou reduzidas se a relação do fator de proteção for de, no mínimo, 1/3 da razão UVA/UVB EU, 2007). A obtenção desta proporção é tecnicamente difícil de alcançar quando se tem uma alta proteção UVA e altos valores de FPS. Um nível elevado de proteção UVA é mais facilmente alcançado com filtros químicos, embora se possa atingir um alto grau de proteção UVA com combinações de filtros físicos e químicos, o que cria uma desvantagem competitiva para fabricantes que contam exclusivamente com filtros físicos. A Figura 5 apresenta uma análise do fator de proteção UVA de

protetores solares pela técnica PPD, com condições de ensaio semelhantes e FPS 50, mas com diferentes valores de FPUVA. Observa-se que os valores de FPUVA (a) é 13 e FPUVA (b) é 21, o que indica, claramente, que um protetor com a formulação equilibrada de UVA/UVB é mais eficaz na proteção contra a radiação solar, e constata que, em se tratando de protetores solares de longo espectro, é imprescindível um equilíbrio na formulação.

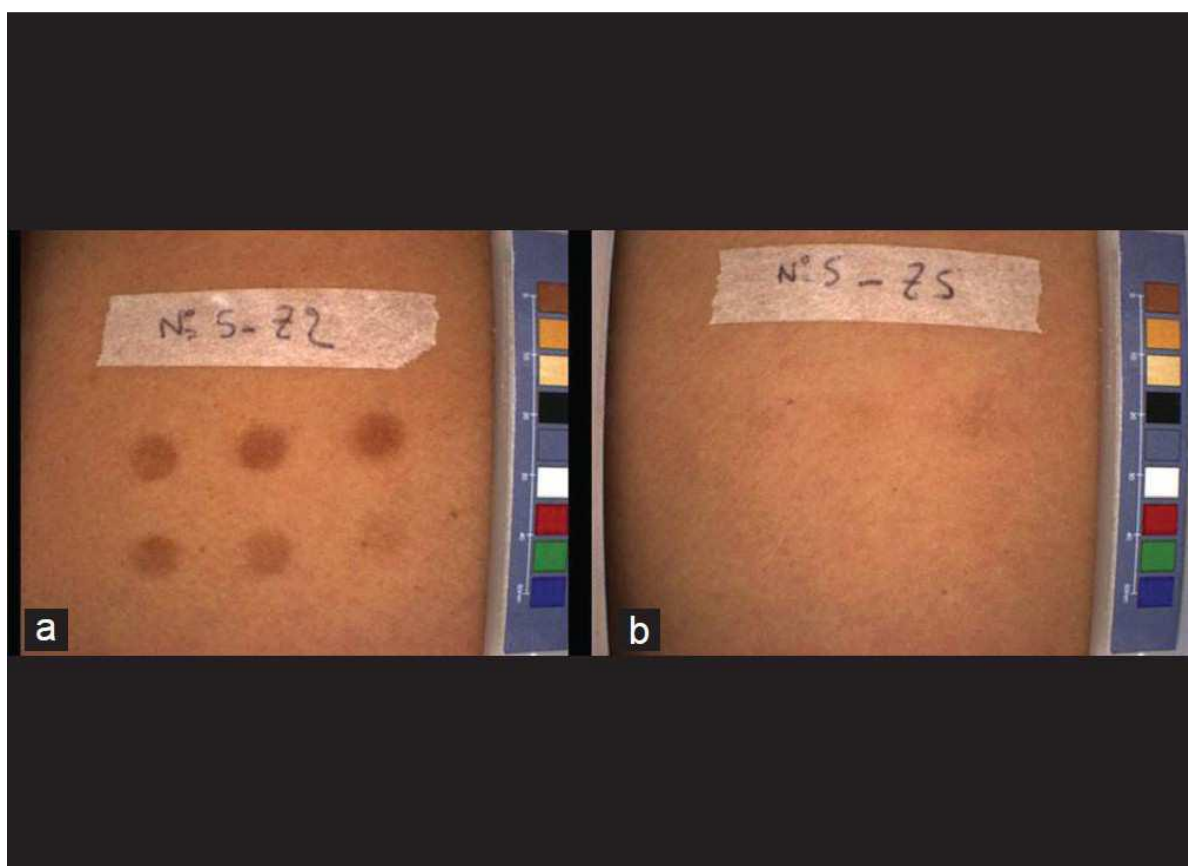


Fig. 6 - Comparativo com protetores solares com mesmo valor de FPS e distintos valores de FPUVA.

5.3.3. Requisitos de rotulagem

Os requisitos de rotulagem divergem entre as agências regulamentadoras. No Brasil, a ANVISA determina que todos os protetores solares devem apresentar, no mínimo, 1/3 de proteção UVA em relação à UVB, sendo desnecessária declaração referente à proteção UVA, constando apenas o FPS do produto. Na União Européia, a proteção UVA deve ser expressa dentro de um círculo sem a presença de qualquer quantificação. No Japão, ficou determinada a representação do FPUVA através estrelas, que variam de uma a três de acordo com o nível de proteção oferecida pelo produto. Já os EUA, Austrália e o Canadá determinam que a proteção UVA seja representada nos rótulos através da expressão “Amplio Espectro”.

As divergências observadas entre as agências reguladoras na determinação da metodologia preconizada, na proporção adequada entre os filtros UVA:UVB e em como representar os resultados nos rótulos dos produtos, afetam tanto o consumidor, quanto a indústria.

A falta de harmonização internacional nos rótulos e metodologias pode dificultar a escolha do produto pelo consumidor no que diz respeito à eficácia de proteção UVA.

Considerando a determinação dada pelo FDA, na qual, independentemente da razão UVA/UVB, rotula-se como um protetor solar de amplo espectro aquele que apresentar alguma proteção UVA, o desenvolvimento de formulações que apresentem um melhor FPUVA é desestimulado, pois não é possível a diferenciação pelo consumidor deste fator na hora da compra. Diferentemente das outras agências, que exigem um mínimo do FPUVA de 1/3 da proteção UVB, garante-se uma maior eficiência dessa proteção. Contudo, ainda existem divergências entre as metodologias utilizadas para a determinação do valor do FPUVA, que influenciam nos resultados de proteção UVA dependendo do método selecionado para a análise.

A determinação do FPUVA vem sofrendo um processo de padronização pela Organização Internacional de Normalização (ISO) que tem como objetivo, além da harmonização global dos métodos de ensaio, a padronização da

rotulagem dos protetores solares no que diz respeito à proteção UVA, já que as diversas formas de representar FPUVA nos rótulos dos produtos geram grande dificuldade para o consumidor na hora de selecionar o protetor mais adequado para sua pele.

6. CONCLUSÃO

Inicialmente, o uso dos protetores solares estava relacionado apenas à proteção contra os raios UVB e, por isso, a eficiência de proteção presente no rótulo referia-se apenas à proteção contra a radiação UVB, através do Fator de Proteção Solar - FPS. Com o avanço dos estudos relacionados à fotoproteção, observou-se que os danos associados à exposição aos raios UVA também são relevantes e podem contribuir com o envelhecimento precoce e o desenvolvimento do câncer de pele. Assim, os protetores solares atuais apresentam proteção também contra a radiação UVA (FPUVA) e a sua eficiência deve ser avaliada pela capacidade de proteção em amplo espectro, ou seja, frente às radiações UVA e UVB.

A preocupação da indústria de cosméticos com suas formulações fotoprotetoras e dos órgãos governamentais com a eficácia destas tem estimulado a busca pela harmonização dos métodos de determinação do FPUVA, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

O presente trabalho compilou diferentes metodologias *in vivo* e *in vitro* disponíveis na literatura e/ou preconizadas pelas agências reguladoras para determinação do FPUVA, possibilitando a observação em âmbito nacional e internacional dos métodos que vem sendo empregados para o estudo dessa proteção, contribuindo, assim, com a harmonização da metodologia de determinação do FPUVA e das normas de rotulagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Fourtanier, F. Bernerd, C. Bouillon, L. Marrot, D. Moyal, S. Seite, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 22 (2006) 22–32.

Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.88, n.2, p.59-62, 2007.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. 2001;20:2413-23. approach. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.24, p.755-767, 2001.

AS/NZS 2604. Sunscreen Products - Evaluation and Classification, 1998.

Australian regulatory guidelines for sunscreens TGA- Version 1.0, November 2012. <www.tga.gov.au>.

B.L. *Diffey*. Article first published online: 19 OCT 2004 .*Journal of Dermatology*. Volume 151, Issue 4, pages 868–872, October 2004

BATISTELA, Mônica Antunes; CHORILLI, Marlus; LEONARDI, Gislaine Ricci.

Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem*. 1999; 274:15345-9.

Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, et al. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem*. 1999; 274:15345-9.

Bickers, D. R.; Athar, M.; *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126, 2565.

Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL. Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol*. 1986;88:1-6.

Boigly, M. Manual de Massagem; 5. Ed. Editora Andrey, 1986.

Boots the Chemist Ltd. (England), The Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA: UVB Ratios According to The Boots Star Rating System. Nottingham: The Boots CO PLC; 2004.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Protetores Solares em Cosméticos. Diário Oficial da União, nº 163, 23 de agosto de 2002. Seção 1E. p. 40.

Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, Chung JH. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009;14:15-9.

Chung KY, Agarwal A, Uitto J, Mauniel A. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1996;271:3272-8.

Colipa Project Team IV, *In vitro* photoprotection methods, Method for the *in vitro* determination of UVA protection provided by sunscreen products. Guideline, 2007.

DE PAOLA, M.V.R.V.; RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. *Cosm. & Toil*. 10:40-50 (1998).

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated

FDA. Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use; Final Monograph, Federal Register, Vol. 64, No. 98, May 21, 1999.

Fischer GJ, Datta S, Wang Z, Li XY, Quan T, Chung JH, et al. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J Clin Invest*.

Flor J, Davolos MR, Corrêa MA. Protetores solares. *Quim Nova*. 2007;30:153-8.
G. Wakefield, M. Green, S. Lipscomb, B. Flutter, *Mater. Sci. Technol.* 20 (2004) 985–988.

G. Wakefield, M. Green, S. Lipscomb, B. Flutter, *Mater. Sci. Technol.* 20 (2004) 985–988.

Gillam, A. E.; Stern, E. S.; *An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy*, 2nd ed., Edward Arnold: London, 1957.

González S, Fernández-lorente M, Gilaberte-Calzada Y. The latest on skin
Griffiths C, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of collagenular; formation in photodamaged human skin by tretinoin(retinoic acid). *N Engl J Med*. 1993;329:530-5.

Guirro, E; Guirro, R. *Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos patologias*; 3. Ed. São Paulo: Editora Manole, 2004.

Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure MJ, Baudouin C, Charveron M, et al. UVA induces granzyme B in human keratinocytes through MIF: implication in extracellular matrix remodeling. *J Biol Chem*. 2007;282:8157-64.

http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma - acessado em 11/12/2013

Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L.; *Inorganic Chemistry: principles*

Ichihashi, M.; Ueda, M.; Budiyanto, A.; Bito, T.; Oka, M.; Fukunaga, M.; Tsuru, K.; Horikawa, T.; *Toxicology* 2003, 189, 21.

JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N.J.; Japan Cosmetic Industry Association Technical Bulletin. Measurement standards for UVA protection efficacy. Issued November 21, 1995 and effective as of January 1, 1996.

Koch H, Wittern KP, Bergemann J. In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be

Krutmann J. The role of UVA rays in skin aging. *Eur J. Dermatol.* 2001;11:1701.

Kuhr, L.; Meewes, C.; Wlaschek, M.; *Exp. Gerontol.* 2000, 35, 307.

Landau M. Exogenous factors in skin aging. *Curr Probl Dermatol.* 2007;35:1-13.

Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet.* 2007;370:528-37.

Leonardi, RL. *Cosmetologia Aplicada*. São Paulo: Editora Santa Isabel, 2008.

Maier T, Korting HC. Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol.* 2005;18:253-62.

MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. *Cosmetics Cosmetics & Toiletries* (edição em português), São Paulo 15:42-53 (2003).

Moon HJ, Lee SR, Shim SN, Jeong SH, Stonik VA, Rasskazov VA, et al. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:284-9.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regul. Toxicol. Pharm.* 33:285-299 (2001). Osterwalder U, Jung K, Seifert M,

Herrling Th Importance of UVA Sun Protection: A Comparative Analysis of Different Quality Control Methods SÖFW-Journal 135 9-2009

Osterwalder, U.; Luther, H.; Herzog, B.; *Cosmet. Toil. (Ed. Port.)* 2000,

Palm MD, O`donoghue MN. Update on photoprotection. *Dermatol Ther.* 2007;20:360-76.

Pereira S. Dermatoses no idoso. In: Rotta O. *Guia de Dermatologia: clinica, cirurgica e cosmiatrica.* São Paulo: Manole; 2008. p.567-91.

Peyrefitte, G; Martini, M; Chivot, M. *Cosmetologia, Biologia Geral e Biologia da Pele.* São Paulo: Editora Andrei Ltda., 1998. *Pharm.* 33:285-299 (2001).

R.B. Setlow, E. Grist, K. Thompson, A.D. Woodhead, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 90 (1993) 6666–6670.

Ray AJ, Turner R, Nikaido O, Rees JL, Birch-Machin MA. The spectrum of mitochondrial DNA deletions is a ubiquitous marker of ultraviolet radiation exposure in human skin. *J Invest Dermatol.* 2000;115:674-9.

Reelfs O, Tyrrel RM, Pourzand C. Ultraviolet a radiationinduced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF-kappaB in human skin fibroblasts.*J Invest Dermatol.* 2004;122:1440-7.

RIBEIRO, C. J. *Cosmetologia aplicada a dermoestética.* São Paulo: Pharmabooks, 2006.

Routaboul C, Denis A, Vinche A. Immediate pigment darkening: description,kinetic and biological function. *Eur J Dermatol.* 1999; 9:95-9.

Ruvolo Júnior, E. C.; *Cosméticos On Line* 1997, 19, 37

SANT'ANNA, Paulo Afrânio; *et al.* A expressão de conflitos psíquicos em afecções dermatológicas: um estudo de caso de uma paciente com vitiligo atendida com o jogo de areia. *Psicologia teoria e prática*, São Paulo, v.5, n.1, p.81-96, jan./jun. 2003.

Santos Filho, P. F.; *Estrutura Atômica & Ligação Química*, 1a ed., Ed. da UNICAMP: Campinas, 1999.

Scharffetter-Kochanek, K.; Brenneisen, P.; Wenk, J.; Herrmann, G.; Ma, W.; Kuhr, L.; Meewes, C.; Wlaschek, M.; *Exp. Gerontol.* 2000, 35, 307.

SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 215 – 225.

Spencer, AP. *Anatomia Humana Básica*; 2. Ed. São Paulo: Editora Manole, 1991.

Steiner, D.; *Cosmet. Toil. (Ed. Port.)* 1995, 10, 29.

Streilein, J. W.; Taylor, J. R.; Vincek, V.; Kurimoto, EPSTEIN, J.H. Biological Effects of Sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH,M.A.; PATHAK, M.A. *Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects*. New York : Marcel Dekker, 1997. p. 589 – 600.

Streilein, J. W.; Taylor, J. R.; Vincek, V.; Kurimoto, MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. *Cosmetics Cosmetics & Toiletries* (edição em português), São Paulo 15:42-53 (2003).

Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006;150:25-38.

Thomas, M.; *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*, 2nd ed., Wiley: New York, TORTORA G. J. Corpo humano – fundamentos de anatomia e fisiologia. Artmed; 6ª edição; 718p, 2006.

Weber MB, Ponzio HA, Costa FB, Camini L. Eritema ab igne: relato de um caso. Na Bras Dermatol. 2005;80:187-8.

Widmer R, Ziaja I, Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: Role in skin aging and neurodegeneration. Free Radic Res. 2006;40:1259–68. Woodhead, 1993; Wakefield; Green; Lipscomb; Flutte; Mater, 2004; Fourtanier; Bernerd; Bouillon; Marrot; Moyal; Seite, 2006).

Wulf HC, Sandby-Moller J, Kobayasi T, Gniadecki R. Skin aging and natural photoprotection. Micron. 2004; 35: 185-91.

Yaar M, Eller MS, Gilchrest BA. Fifty years of skin aging. J Investig Dermatol Symp Proc. 2002;7:51-8.