UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

> Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Sônia Aparecida Figueiredo

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

> Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Sônia Aparecida Figueiredo

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 07/12/2016. A versão original encontrase disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Figueiredo, Sônia Aparecida

Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB. Ribeirão Preto, 2016.

122 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos. Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca.

1. Eficácia. 2. Protetor solar. 3. Técnicas de Cultura de Células. 4. Métodos alternativos. 5. Radiação Ultravioleta.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sônia Aparecida Figueiredo

Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:



I minha mamãe, Elza, a meu papai, João Reis (in memorian) e a todos os "anjos" que contribuíram para essa minha conquista.

Agradecimentos

À Deus, pela presença contínua em minha vida, pela saúde, pelas oportunidades, pela força para enfrentar todos os obstáculos, por todas as conquistas e pelos "anjos" que Ele colocou em meu caminho.

À minha querida orientadora e amiga, Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca, por ter acreditado em mim, pelos conhecimentos e valores transmitidos, pelo incentivo, por todo tempo dedicado na minha formação profissional e pessoal e pelo exemplo de profissionalismo e ser humano.

As amigas do nosso grupo de pesquisa que me ajudaram, incentivaram e estiveram ao meu lado durante todos esses anos: Ana Luiza, Daniele, Dayane, Fernanda, Geórgia, Karini, Michelle, Rebeca, Sílvia e Vanessa.

À Dayane C. de Moraes e Michelle de Andrade pela parceria, incentivos, momentos compartilhados e amizade.

À Fernanda M. P. Vilela por ter participado, contribuído e incentivado toda minha trajetória na Pós-Graduação e também pela amizade.

À Amanda Natalina Faria pela grande contribuição na segunda etapa deste meu trabalho, pelo incentivo e pela amizade de muitos anos.

Ao técnico, José Roberto Jabor, pela contribuição, auxílio, dedicação, incentivo e palavras de carinho e amizade que em muitos momentos foram essenciais.

Aos técnicos da FCFRP-USP: Angélica, Aninha, Cris, Eduardo, Emerson, Luizão, Mário, Patrícia, Valtinho e Yara pela preciosa ajuda e contribuição ao meu estudo.

Aos professores da FCFRP-USP: Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dr^a Carolina Patrícia Aires, Dr^a Eliane Candiani Arantes Braga, Dr^a Luciane Carla Alberici, Dr^a Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos, Dr. Sérgio Akira e Dr^a Yara Maria Lucisano Valim por disponibilizarem, gentilmente, os equipamentos em seus laboratórios e, até mesmo, alguns reagentes, todos essenciais para realização desse trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP: Eleni Angeli Passos, Henrique Theodoro, Rafael Braga Poggi, Rosana Ferreira L. S. Florêncio e Rosemary Ioshimine Gerolineto pela ajuda, pela eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados. Aos funcionários da FCFRP-USP: portaria, copa e limpeza pelo auxílio, gestos de carinho e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

Aos amigos Bianca, Carla, Cristiane, Danni (Sister), Débora, Deidi, Fernanda, Flávia, Giovanna, Giuliana, Ivan, Júlia, Lílian, Lívia Hernandes, Luciana, Marcela, Margarete, Mariana Martins, Marivane, Mariza, Maurette, Profa. Glória, Rafaela, Rosana, Samir, Tais, Tatiane pelos gestos e palavras de incentivo e pela amizade sincera.

Aos "anjos" amigos Dimas/Rita e família, Enedi/Lena e família, Fernanda e família, Sra. Laura e família, Elisa e família, que contribuíram cada um de uma maneira para a trajetória de minha vida.

Ao Rafael por todo o apoio, palavras de incentivo, gestos de carinho e amor.

A minha mamãe, pelo amor e apoio incondicionais, razão do meu viver. Amo inexplicavelmente.

A meu papai (*in memorian*), pelo amor, exemplo de caráter, honestidade e ser humano. Sei que este momento seria de muito orgulho. Amo eternamente.

Aos meus irmãos, cunhados e minha sobrinha/afilhada pelo apoio, compreensão e confiança depositada durante toda a minha caminhada.

As minhas vovós Ana e Meire (*in memorian*) que sempre estiveram presentes em cada momento com suas orações.

Aos meus demais familiares que, mesmo à distância, contribuíram e apoiaram mais uma conquista.

A todos que participaram e contribuíram para mais esta conquista, gostaria de deixar uma oração especial.

Antiga Benção Celta

Que o caminho venha ao teu encontro. Que o vento sempre sopre às tuas costas e a chuva caia suave sobre teus campos. E até que voltemos a nos encontrar, que Deus te sustente suavemente na palma de sua mão.

Que vivas todo o tempo que quiseres e que sempre possas viver plenamente. Lembra sempre de esquecer as coisas que te entristeceram, porém nunca esqueças de lembrar aquelas que te alegraram.

Lembra sempre de esquecer os amigos que se revelaram falsos, porém nunca esqueças de lembrar aqueles que permaneceram fiéis Lembra sempre de esquecer os problemas que já passaram, porém nunca esqueças de lembrar as bênçãos de cada dia.

Que o dia mais triste de teu futuro não seja pior que o dia mais feliz de teu passado. Que o teto nunca caia sobre ti e que os amigos reunidos debaixo dele nunca partam.

Que sempre tenhas palavras cálidas em um anoitecer frio, uma lua cheia em uma noite escura, e que o caminho sempre se abra à tua porta. Que vivas cem anos, com um ano extra para arrepender-te. Que o Senhor te guarde em sua mão, e não aperte muito seus dedos.

Que teus vizinhos te respeitem, os problemas te abandonem, os anjos te protejam, e o céu te acolha. E que a sorte das colinas Celtas te abrace.

Que as bênçãos de São Patrício te contemplem. Que teus bolsos estejam pesados e teu coração leve. Que a boa sorte te persiga, e a cada dia e cada noite tenhas muros contra o vento, um teto para a chuva, bebidas junto ao fogo, risadas que consolem aqueles a quem amas, e que teu coração se preencha com tudo o que desejas.

Que Deus esteja contigo e te abençoe, que vejas os filhos de teus filhos, que o infortúnio te seja breve e te deixe rico de bênçãos.

Que não conheças nada além da felicidade, deste dia em diante. Que Deus te conceda muitos anos de vida; com certeza Ele sabe que a terra não tem anjos suficientes... E assim seja, a cada ano, para sempre!

Muito obrigada!

"Não existe melhor Cosmético que a FELICIDADE"

Marguerite Gardiner, Condessa de Blessington – Escritora Irlndesa (1789-1849)

RESUMO

FIGUEIREDO, S. A. Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB. 2016. 120 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A eficácia de protetores solares é determinada por métodos *in vivo*, que utilizam humanos, tais como: Fator de Proteção Solar (FPS), Immediate Pigment Darkening (IPD), Persistent Pigment Darkening (PPD) e Fator de Proteção UVA (FP-UVA). No entanto, esses parâmetros não refletem os efeitos danosos reais induzidos pela radiação solar sobre as estruturas e componentes celulares, como o DNA, lipídeos e proteínas. O objetivo deste estudo foi desenvolver ensaios in vitro com culturas de células para avaliar o potencial fotoprotetor de protetores solares empregando parâmetros biológicos que são alterados pela radiação UV. A primeira etapa deste estudo consistiu em selecionar a linhagem de células da pele (L929 ou HaCaT) que fornecesse a melhor relação entre dose de UVA ou UVB e o efeito danoso induzido. Este efeito foi quantificado pela medida da viabilidade celular, peroxidação lipídica e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O melhor modelo de cultura celular foi tratado com protetores solares de duas marcas diferentes com FPSs de 15 a 60, obtidos no mercado local. Amostras dos fotoprotetores foram aplicadas em uma placa de quartzo colocada no topo de uma microplaca preenchida por células. A viabilidade celular e a peroxidação lipídica, medidas em fibroblastos L929, foram os parâmetros mais promissores para avaliar a eficácia de protetores solares expostos à UVB e permitiram discriminar o potencial fotoprotetor de formulações com diferentes FPSs. Por outro lado, a formação de EROs, expressa em queratinócitos HaCaT, provou ser um parametro biológico promissor para discriminar a eficácia de protetores solares com diferentes FPSs ou FPSs/PPDs, expostos à UVA. Atualmente, as empresas estão adicionando aos protetores solares filtros orgânicos que absorvem na região do UVA, principalmente na faixa do UVA-1. Alguns pesquisadores têm demonstrado que o proteoma é o alvo para as EROs induzidas por UVA. Essas EROs diminuem a atividade da calcineurina (Cn), enzima conhecida pelo seu papel no recrutamento de células T. A liberação do ânion fosfato do substrato, pela ação da enzima, reduz com o aumento da exposição da Cn à radiação UVA-1. Desta forma, um método foi desenvolvido com células primárias HDFn para a avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares na faixa de UVA-1, empregando a medida da atividade da Cn. Os resultados mostraram que a redução da atividade da Cn só foi proporcional a dose de UVA-1 quando o homogeneizado de células HDFn, contendo 417,55 \pm 8,79 µg/mL de proteínas, foi exposto a diferentes doses de UVA-1. Quando as culturas de células foram irradiadas por diferentes doses de UVA-1, não foi observado diminuição da atividade da enzima. Em adição, para maior precisão na medida da atividade enzimática, os homogeneizados, expostos ou não à luz UVA-1 e protegidos ou não por diferentes protetores solares, tiveram que ser diluídos na proporção de 1:2 em tampão ensaio 2x (1:1, v/v), antes da quantificação do fosfato por verde de malaquita. A medida da atividade da Cn mostrou ser um ensaio eficiente para diferenciar fotoprotetores adicionados de filtros orgânicos específicos para faixa de UVA-1 (marca B) daqueles não adicionados desses filtros (marca A). Como também, o ensaio foi capaz de diferenciar os protetores solares da marca B, com diferentes valores de PPD: fotoprotetor com PPD-15 não foi capaz de evitar a redução da atividade enzimática, semelhante ao homogeneizado exposto à luz UVA-1 sem proteção, mas diferenciou dos demais PPDs; PPDs 25 e 41 protegeram a atividade da Cn em $34,53 \pm 4,15\%$ e $38,19 \pm 5,50\%$, respectivamente. Assim, os parâmetros biológicos testados neste estudo podem atuar como alternativas complementares para avaliação da eficácia de fotoprotetores.

Palavras-chave: Eficácia, Protetores solares, Técnicas de Cultura de células, Métodos *in vitro*, Radiação Ultravioleta.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, S. A. Development and validation of *in vitro* assys using immortalized and primary cells culture for the evaluation of the photoprotective efficacy of sunscreens using as measurement parameters the changes induced in the skin by UVA and UVB radiation. 2016. 120 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The effectiveness of sunscreens is usually determined by *in vivo* methods, which use humans, such as Sun Protection Factor (SPF), Immediate Pigment Darkening (IPD), Persistent Pigment Darkening (PPD) and UVA Protection Factor (UVA-PF). However, these parameters do not reflect the real damaging effects induced by solar radiation on the structures and cellular components as the DNA, lipids and proteins. The aim of this study was to develop in vitro methods with cell culture to assess the photoprotective potential of sunscreens using biological parameters that are changed by UV radiation. The first stage of this study to select the skin cells strain (L929 or HaCaT) that would provide the best relationship between dose of UVA or UVB radiation and induced deleterious effect. This effect was quantified by measuring cell viability, lipid peroxidation and generation of reactive oxygen species (ROS). The best cell culture model was treated with commercial sunscreens two brands with SPF 15-60, obtained from a local market. Sunscreens samples were applied in a quartz plate placed on top of a microplate filled with cells. The cell viability and lipid peroxidation measured in L929 fibroblasts were the most promising for evaluating the efficacy of sunscreens exposed to UVB radiation and allowed to discriminate the photoprotective potential of formulations with different SPFs. On the other hand, ROS generation expressed in keratinocyte of the HaCaT proved to be a promising biological test for discriminating the effectiveness of sunscreens with different SPFs or SPFs/PPDs exposed to UVA radiation. Currently, companies are adding organic filters in sunscreens that absorb in the UVA region, especially in the UVA-1 range. Some researchers have shown that proteomics is the target for ROS induced by UVA. These ROS decrease the activity of calcineurin (Cn), an enzyme known for its role in T cell recruitment. The release of phosphate anion from substrate by enzyme action, it reduces with increasing exposure of Cn to UVA-1 radiation. Thus, a method was developed with HDFn primary cells for evaluation of photoprotective efficacy of sunscreens in the UVA-1 range, using the measure of Cn activity. The results showed that the reduction of Cn activity was only proportional to the dose of UVA-1 when the HDFn cell homogenate, containing 417.55 \pm 8.79 mg/mL protein, was exposed to different doses of UVA-1. When cell cultures were irradiated with different doses of UVA-1, there was no reduction in enzyme activity. In addition, for greater precision in the measurement of enzymatic activity, the homogenates, exposed or not to UVA-1 radiation and protected or not with different sunscreens, they had to be diluted at a ratio of 1:2 in buffer before of phosphate quantification for malachite green. The measure of Cn activity proved to be an efficient test to differentiate photoprotectors added specific organic filters for UVA range (brand B) of those not added these filters (brand A). As well, the assay was able to differentiate the sunscreens of brand B, but with different values of PPD: photoprotector with PPD-15 was not able to prevent the reduction of enzyme activity, similar to the homogenate exposed to UVA light without protection, but differentiated from other PPDs; PPDs 25 and 41 protected the activity of Cn to $34.53 \pm 4.15\%$ and $38.19 \pm 5.50\%$, respectively. Thus, the biological parameters tested in this study can serve as additional alternatives for assessing the effectiveness of sunscreens.

Keywords: Efficacy, Sunscreens, Cell culture techniques, *in vitro* methods, Ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Representação do mecanismo de ativação da enzima calcineurina......7

Figura 5. Espectros de emissão das lâmpadas ultravioletas empregadas no estudo.....25

Figura 7. Procedimento de irradiação das culturas de células L929 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos) à diferentes doses de radiação UVA e UVB......27

 Figura 10. Representação esquemática do procedimento de obtenção do lisado de células HDFn.
 37

Figura 14. Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca A, obtidos da análise qualitativa por CLAE.......46

Figura 15. Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca B, obtidos da análise qualitativa por CLAE.......47

Figura 16. Determinação da viabilidade celular medida pelo ensaio do coranteresazurinaapósexposiçãoàradiaçãoUVA.......48

Figura 20. Determinação da peroxidação lipídica medida com base na formação do complexo ácido tiobarbitúrico-malondialdeído após exposição a 30 J/cm² de radiação

Figura 26. Quantificação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de queratinócitos HaCaT protegidas com diferentes concentrações do extrato de *Garcinia brasiliensis* e de astaxantina após exposição à 20 J/cm² radiação UVA....58

Figura	27.	Curva	de	calibração	de
fosfato			60		

Figura 29. Atividade de calcineurina expressa em percentual e quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerada no lisado de células de fibroblastos primários (HDFn) expostos a diferentes quantidades de radiação UVA-

1......63

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. Composição de filtros UV, orgânicos e inorgânicos, presentes nos protetores solares comerciais das marcas A e B e seus respectivos valores de fator de

proteção

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6,4-Pirimidina-Pirimidona

ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína Ativadora-1
AP-2	Proteína Ativadora-2
ARGS	Australian Regulatory Guidelines for Sunscreens
ASC	Área Sob a Curva
AVO	Avobenzone
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BEMT	Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazone
Ca ²⁺	Íons Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CaM	Calmodulina
САТ	Catalase
CI	Controle Irradiado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cn	Calcineurina
CnA	Subunidade Catalítica A
CnB	Subunidade Reguladora B
CnI	Inibidor de Calcineurina
CNI	Controle Não Irradiado
CO ₂	Dióxido de Carbono
COLIPA	Cosmetic European, Personal Care and Perfumery Association

COX-2	Ciclooxigenase-2
СРК	Proteína Quinase C
cPLA ₂	Fosfolipase Citosólica A ₂
DAG	Diacilglicerol
DCFH ₂ -DA	2,7-Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína
DEM	Dose Eritematosa Mínima
DI	Diâmetro Interno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPCs	Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTS	Drometrizole Trisiloxane
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EHS	Ethylhexyl Salicylate
EHT	Ethylhexyl Triazone
ERK	Quinase Reguladora por Sinal
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase Estacionária

FM	Fase Móvel
FPS	Fator de Proteção Solar
FP-UVA	Fator de Proteção - Ultravioleta A
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Ácido Clorídrico
HDFn	Human Dermal Fibroblast, neonatal
HEPES	4-(2-Hidroxietil) Piperazina-1-Ácido Etanossulfônico
HMS	Homosalate
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
INCI	International Nomenclature Cosmetic Ingredient
IP3	Inositol 1,4,5-Trifosfato
IPD	Immediate Pigment Darkening
ISSO	Organização Internacional de Normatização
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KDa	Quilolodaltons

K _{Ds}	Constante de Dissociação
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L	Largura
L.	Radical Alquila
LDH	Lactato Desidrogenase
LO'	Radical Alcoxila
Log	Logaritmo
LOO'	Radical Peroxila
MDA	Malondialdeído
MDA-TBA	Complexo Malondialdeído-Ácido Tiobarbitúrico
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
Mod.	Modelo
Ν	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
NF-κβ	Fator Nuclear Kappa Beta
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NP-40	Nonidet P-40

ns	Não houve diferença estatística significativa
ОСТ	Octocrylene
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTC	Over The Counter
p/p	Peso por Peso
p38 MARK	Proteína Quinase p38 Ativada por Mitógeno
РА	Padrão Anidro
PABA	Ácido 4-Aminobenzoico
PEG	Polietilenoglicol
PF	Padrões de Filtros
PG	Prostaglandina
Pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial de Hidrogênio
PLC-γ	Fosfolipase C Gama
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PP1	Proteína Fosfatase 1
PP2A	Proteína Fosfatase 2A
PP2B	Proteína Fosfatase 2B (Calcineurina)
PP2C	Proteína Fosfatase 2C

PPD	Persistent Pigment Darkening
PPs	Proteína Fosfatase Serina/Treonina
PS	Protetores Solares
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species
RUV	Radiação Ultravioleta
SBF	Soro Bovino Fetal
Ser	Serina
SOD	Superóxido Dismurase
SP	São Paulo
SPF	Sun Protection Factor
STOP	Parar
ТА	Temperatura Ambiente
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TDSA	Terephthalydene Dicamphor Sulfonic Acid
TEA	Trietanolamina
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta
Thr	Treonina

TiO ₂	Dióxido de Titânio
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ΤΝΓ-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tyr	Tirosina
U	Unidade de Atividade
UFV-MG	Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVA-1	Ultravioleta A-1
UVA-2	Ultravioleta A-2
UVA-PF	UVA - Protection Factor
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Volume por Volume
VM	Verde de Malaquita
ZnO	Óxido de Zinco

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. Introdução	1
1.1. Efeitos da radiação solar sobre a pele	2
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Material e Métodos	19
3.1 Protetores solares comerciais	20
3.1.1 Confirmação da presença dos filtros orgânicos descritos na composição dos	protetores
solares comerciais por CLAE	21
3.1.1.1 Processo de extração e recuperação dos filtros orgânicos	22
3.1.1.2 Perfil cromatográfico	24
3.2 Desenvolvimento de ensaios in vitro para avaliação do potencial fotoprotetor de	protetores
solares usando cultura de célula	25
3.2.1 Fonte de Radiação UVA e UVB	25
3.2.1.1 Qualificação de Desempenho do Sistema de Irradiação UV	
A) Definição da posição das microplacas sobre a bandeja usando a medida de	e radiação
emitida pelas lâmpadas UVA e UVB	
B) Distância entre a bandeja e as lâmpadas fluorescentes	27
C) Equipamento de irradiação protegido ou não da incidência de luz ambiente	27
3.2.2. Desenvolvimento de ensaios in vitro para avaliação da eficácia fotoprotetora	27
3.2.2.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	
3.2.2.2. Parâmetros biológicos empregados na avaliação da eficácia fotoprotetora	
3.2.2.2.1. Viabilidade Celular	
3.2.2.2.2. Peroxidação Lipídica	29
3.2.2.3 EROs intracelulares	
3.2.2.3. Validação dos ensaios in vitro	
3.2.2.4. Análise estatística	

SUMÁRIO

3.2.3. Desenvolvimento de ensaio in vitro para avaliação de eficácia fotoprotetora de
protetores solares na faixa de absorção UVA-1
3.2.3.1. Desenvolvimento do ensaio para medida da atividade da calcineurina
3.2.3.1.1. Quantificação de fosfato inorgânico usando o reagente verde de malaquita
A. Preparo das soluções de fosfato de potássio
B. Preparo do reagente verde de malaquita
C. Obtenção da curva de calibração
D. Análise estatística
3.2.3.1.2. Determinação das condições reacionais ideais de medida da atividade da
calcineurina
3.2.3.2. Determinação das condições de medida da atividade da calcineurina em lisados de
células primárias
3.2.3.2.1. Células primárias e seu cultivo
3.2.3.2.2. Obtenção do lisado celular
3.2.3.2.3. Irradiação do lisado celular e definição da dose de UVA-1
3.2.3.2.4. Estabelecimento das condições reacionais ideais para medida da atividade da
calcineurina no lisado celular
3.2.3.2.5. Avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares contra a radiação UVA-1
pela medida da atividade da calcineurina nos lisados de células primárias41
3.2.3.2.6. Avaliação da precisão do ensaio in vitro de medida da eficácia de protetores solares
pela medida da atividade de calcineurina nos lisados de células primárias
3.2.3.2.7. Análise estatística
4. Resultados
4.1 Confirmação da presença dos filtros orgânicos descritos na composição dos protetores
solares comerciais por CLAE
4.2. Desenvolvimento de métodos in vitro para avaliação do potencial fotoprotetor de
protetores solares
4.2.1. Avaliação de desempenho do sistema de irradiação
4.2.2. Desenvolvimento de ensaios in vitro para medida da eficácia fotoprotetora de protetores
solares contra as radiações UVA e UVB, usando cultura de células
4.2.2.1. Linhagens celulares e parâmetros biológicos
4.2.2.1.1. Viabilidade celular
4.2.2.1.2. Peroxidação Lipídica
4.2.2.1.3. EROs intracelulares

4.2.2.2. Validação dos ensaios in vitro de avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores
solares
4.2.3. Desenvolvimento de ensaio in vitro para avaliação da eficácia fotoprotetora na faixa de
absorção UVA-1
4.2.3.1. Desenvolvimento de ensaio para medida da atividade da calcineurina
4.2.3.1.1. Quantificação de fosfato inorgânico usando o reagente verde de malaquita609
4.2.3.1.2. Determinação das condições ideais de medida da atividade da calcineurina61
4.2.3.1.3. Determinação das condições de medida da atividade da calcineurina em lisados de
células primárias
4.2.3.1.3.1 Células primárias
4.2.3.1.3.2. Obtenção do lisado celular
4.2.3.1.3.3. Irradiação do lisado celular e definição da dose de UVA-1
4.2.3.1.3.4. Estabelecimento das condições reacionais ideais para medida da atividade da
calcineurina no lisado celular
4.2.3.1.3.5. Avaliação da eficácia fotoprotetora dos protetores solares contra a radiação UVA-
1 pela medida da atividade da calcineurina nos lisados de células primárias675
4.2.3.1.3.6 Avaliação da precisão do ensaio in vitro de medida da eficácia de protetores
solares pela medida da atividade de calcineurina nos lisados de células primárias
5. Discussão
6. Conclusões
7. Referências

_Introdução___

1. Introdução

1.1. Efeitos da radiação solar sobre a pele

A radiação solar compreende um tipo de energia renovável que impulsiona processos químicos, físicos e biológicos na Terra (MANZANO et al., 2015). É constituída por um espectro contínuo de radiação eletromagnética dividida em três regiões principais, segundo seu intervalo de comprimento de onda (λ): radiação ultravioleta (UV) (100-400 nm), luz visível (400-780 nm) e radiação infravermelha (> 780 nm), cujos percentuais de incidência sobre a superfície terrestre correspondem a 5%, 39% e 56%, respectivamente (MATSUMURA, ANANTHASWAMY, 2004; BALOGH et al., 2011).

Uma convenção dermo-fotobiológica internacional dividiu a fração UV da radiação solar em três faixas. A radiação UVC (100-280 nm) é extremamente lesiva aos seres humanos por ser bastante energética, mas é absorvida pela camada de ozônio e não atinge a superfície da Terra (MANCEBO et al., 2014; DAMIANI, ULLRICH, 2016). Os raios UVB (280-320 nm) apresentam menor comprimento de onda e são considerados mais energéticos que os raios UVA; possuem baixo poder de penetração na pele e por isso, atingem a camada mais superior denominada de epiderme, onde causa o eritema (queimadura solar); são responsáveis por danos diretos ao DNA e correspondem a 5% da radiação UV que atinge a Terra (SAMBANDAM, RATNER, 2011; COSTA et al., 2015).

A fração UVA (320-400 nm), que posteriormente foi subdividida em UVA-1 (340-400 nm) e UVA-2 (320-340 nm), é a radiação que penetra profundamente na pele, atingindo a camada dérmica. Ela estimula o bronzeamento e a pigmentação, está relacionada ao envelhecimento da pele e, frequentemente, não causa eritema. Esta radiação é considerada a mais abundante na superfície da Terra e corresponde a 95% da radiação UV do espectro solar (BALOGH et al., 2011; PESCIA et al., 2012; SAMBANDAM, RATNER, 2011; VENDITTI et al., 2011).

Na epiderme e derme, os raios UVB e principalmente, a radiação UVA são absorvidos por cromóforos celulares como o DNA, RNA, porfirinas, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano), melaninas e seus precursores, entre outros, e promovem reações fotoquímicas e interações secundárias que geram as espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas EROs podem iniciar os efeitos danosos induzidos pela radiação solar à pele (TOSATO et al., 2015; BALOGH et al., 2011; ROMANHOLE et al., 2016; MANCEBO et al., 2014).

Os efeitos deletérios estão relacionados ao desequilíbrio entre o aumento na produção das EROs induzida por UV e os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) da pele humana que resultam no estresse oxidativo e, consequentemente, em fotodanos ao DNA, proteínas e membranas (SAITOH et al., 2011; ARIMON et al., 2015).

A exposição crônica à radiação UVB intensa pode lesar diretamente o DNA (SAMBANDAM, RATNER, 2011; MANCEBO et al., 2014). Estas lesões destorcem amplamente a estrutura do DNA e são produzidas pela interação direta da radiação UVB com a molécula de ácido desoxirribonucleico. Tais modificações podem ser do tipo: dímeros de pirimidina cicloabutano (DPCs), formados por duas bases pirimidínicas (timina e citosina) sucessivas ou espacialmente próximas; os fotoprodutos 6,4-pirimidina-pirimidona (6,4-PPs) que são formados por uma ligação covalente entre os carbonos 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas; a ruptura das fitas de DNA e a formação de ligações cruzadas entre essas fitas. Estas modificações podem ser reparadas pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Caso isto não aconteça, esses erros podem perpetuar na forma de mutações sendo incorporadas ao DNA das células filhas. A acumulação sequencial de mutações responsáveis pelo controle da proliferação celular, da morte celular programada e da manutenção da integridade do genoma, culmina na expansão clonal dessas células filhas modificadas, seguida pela fase de progressão irreversível, em que o processo evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas do câncer de pele (ARORA et al., 2015; TOSATO et al., 2015; DING et al., 2008; DAMIANI, ULLRICH, 2016).

As membranas celulares também são alvo da ação da radiação UVB e de modo consequente, da atividade das EROs, acarretando com isso, em danos oxidativos denominados de peroxidação lipídica (HIDRATA, SATO, SANTOS, 2004). O processo de lipoperoxidação consiste em uma cascata de eventos bioquímicos gerando peróxidos lipídicos e derivados (L[•], LO[•], LOO[•]) que promovem alterações na permeabilidade das membranas, falência dos mecanismos de troca de metabólitos (perda da seletividade), alterações no DNA e até mesmo a morte celular (LIMA, ABDALLA, 2001; POLTE, TYRRELL, 2004). A desorganização na membrana celular também resulta na liberação de fosfolipídeos que atuam sinergicamente, contribuindo para o aumento da atividade da fosfolipase citosólica A₂ (cPLA₂) e da ciclooxigenase 2 (COX-2), ambas induzidas pela radiação UV, ocasionando na formação de leucotrienos e prostaglandinas (PG), com destaque para a prostaglandina E₂ (PGE₂), que contribui para a inflamação da pele (HALLIDAY, 2005; COSTA, 2015).

A incidência de radiação UVB sobre a pele também causa um processo inflamatório, em resposta a um dano tecidual ocorrido no local. Este processo engloba uma cascata de eventos que inicia-se com a vasodilação arteriolar que resulta em um aumento no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular com migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) da circulação sanguínea para o tecido lesionado. A dilatação acontece devido a ação da PGE₂ associada ao óxido nítrico (NO - produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) expressada após exposição contínua à radiação UV) e em presença de histaminas. A migração leucocitária é decorrente da presença de substâncias quimiotáticas como por exemplo as quimiocinas no sítio inflamatório. Em seguida, ocorre a ativação de múltiplas vias de sinalização acionadas pela ação das EROs e de danos diretos provenientes de UVB. As vias quinase reguladora por sinal (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38MARK ativam a transcrição de fatores de ativação de proteína 1 (AP-1) e fator nuclear kappa beta (NFκ-β). Este processo induz a regulação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (factor de necrose tumoral alfa – TNF- α , interleucina 1 beta - IL-1 β , fator de crescimento transformante beta - TGF- β e interferon gama – INF- γ), envolvidos na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse oxidativo e apoptose. A fase final consiste na restauração da saúde do tecido com a redução do recrutamento de granulócitos, a vasodilação e a reversão da permeabilidade vascular, além do processo de fagocitose das células mortas (KIM, HE, 2014; FIGUEIREDO et al., 2014; COSTA, 2015; DAMIANI, ULLRICH, 2016).

Cerca de 95% da radiação UV, que incide sobre a pele humana, corresponde a fração UVA, cuja exposição repetitiva e prolongada é responsável por efeitos crônicos que também são decorrentes do estresse fotooxidativo mediado por EROs. Sendo que, esses efeitos são responsáveis por alterações estruturais e funcionais em lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, modulação de proteínas estruturais (actina, colágeno, elastina), de enzimas (p38MAPK, calcineurina, MMPs) e de fatores de transcrição (AP-1, AP-2, NF- $\kappa\beta$) (LAMORE, WONDRAK, 2013) que contribuem para a fotocarcinogênese. E também, pela formação de rugas com perda da elasticidade dos tecidos (redução das fibras colágenas e elásticas) e de suas propriedades mecânicas, pelo espessamento da camada espinhosa resultando na aparência irregular e por alterações histoquímicas, fenômenos estes responsáveis pelo fotoenvelhecimento/envelhecimento precoce da pele (BALOGH et al., 2011; HIDRATA, SATO, SANTOS, 2004).

A radiação UV (RUV) tem também a capacidade de inibir reações imunes locais após ser absorvida pelos fotorreceptores epidérmicos, podendo também afetar o sistema imunológico geral após incidência em altas doses (SCHWARZ, SCHWARZ, 2011; TOSATO et al., 2015). Essa radiação atua de modo antígeno-específico por meio da geração de células T reguladoras, promove a depleção das células de Langerhans epidérmicas (responsáveis pela apresentação de antígenos a células T), o acúmulo de células dendríticas nos nódulos linfáticos, o influxo de células dendríticas e macrófagos na derme e a produção de mediadores imunológicos na pele, como as prostaglandinas, a histamina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas (IL) -1 e -10 (mediador solúvel que entra na circulação podendo causar imunossupressão sistêmica). Com isso, a imunossupressão oriunda da RUV desempenha papel crucial na indução de câncer de pele sendo o tipo de câncer que mais cresce no mundo (NORVAL, EL-GHORR, 1998; KATIYAR, 2007; CONNOLLY et al., 2014; SCHWARZ, SCHWARZ, 2011).

A calcineurina, uma fosfatase serina/treonina dependente de Ca²⁺/calmodulina, é conhecida como controladora central da resposta imune por atuar na imunidade adquirida com a apresentação de antígenos à células T reguladoras (SMIT et al., 2008; MUSSON et al., 2011). Esta enzima está relacionada a ativação de células T, a sinalização transcricional, ao crescimento e desenvolvimento muscular, aos mecanismos de apoptose e de reparo do DNA, a saúde cardíaca e neuronal, a formação de ossos, além de atuarem em células β -pancreáticas e na pele (MUSSON, SMIT, 2011; LI, RAO, HOGAN, 2011; ZHAO et al., 2014).

A calcineurina (Cn) é um heterodímero dividido em subunidade catalítica ligada à calmodulina de 60 KDa, calcineurina A (CnA), e subunidade reguladora constituída de uma proteína de 19 KDa ligada ao Ca²⁺, calcineurina B (CnB). A CnA possui um domínio catalítico N-terminal, um segmento helicoidal de ligação à CnB, um segmento de ligação à calmodulina e um peptídeo auto-inibitório, sendo que as três últimas regiões compõem a região reguladora da subunidade (Figura 1A) (YE et al., 2013; CEN et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

A ativação da Cn envolve a participação de duas mãos-EF distintas, compostas de uma subunidade para a CnB, fortemente associado com a CnA, e de uma subunidade para a calmodulina que é dependente de Ca²⁺. A CnB tem quatro mãos-EF que se ligam a quatro íons Ca²⁺ (Figura 1B). Os sítios de ligação 1 e 2 no lóbulo N-terminal são de baixa afinidade, com K_ds (constantes de dissociação ou concentrações de Ca²⁺ necessárias para metade da ocupação) na escala de micromolar. Esses locais funcionam como sensores de Ca²⁺ com papel

regulador, pois sua ocupação é dependente da elevação de Ca^{2+} intracelular. Enquanto que, os sítios de ligação 3 e 4, localizados no lóbulo de ligação C-terminal, apresentam alta afinidade para o Ca^{2+} (K_ds na escala de nanomolares), atuam como estabilizadores da estrutura heterodimérica da calcineurina (locais estruturais) e não podem ser facilmente descalcificados. A ocupação desses sítios resulta na estimulação parcial da atividade da calcineurina e o mais importante, permite a sua ligação à calmodulina no sítio alvo de regulação, de modo dependente de Ca^{2+} (LI, RAO, HOGAN, 2011; YE et al., 2013).



Figura 1 - Representação do domínio organizacional da enzima calcineurina, sendo (A): a subunidade catalítica (CnA) e (B): a subunidade reguladora (CnB). Retirado de Li, Rao, Hogan (2011).

Para a ativação da enzima Cn é necessário que ocorra um aumento na concentração intracelular de íons cálcio e a sua ligação nos locais de baixa afinidade na CnB (enzima parcialmente ativa), induzindo uma alteração conformacional no domínio regulador da CnA resultando na exposição do domínio de ligação a calmodulina. A elevação dos níveis de cálcio também promove sua ligação à proteína calmodulina (etapas I, II e III – Figura 2). Como resultado, a calmodulina liga-se reversivelmente a CnA promovendo o deslocamento do peptídeo auto-inibitório (obstáculo estérico) altamente flexível e limitador ao acesso de substratos, localizado próximo à entrada do sítio ativo. Essa mudança conformacional resulta na ativação completa da Cn (etapa IV – Figura 2) (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, REDONDO, 2004; LI, RAO, HOGAN, 2011; YE et al., 2013).



Figura 2 - Representação do mecanismo de ativação da enzima calcineurina. A etapa I consiste em baixa concentração de cálcio e na inativação da enzima. A ocupação de íons Ca²⁺ nos locais de baixa afinidade na subunidade CnB causa uma dissociação da região de ligação a calmodulina e possibilita a transição da etapa I para a etapa II, facilitando a ligação da calmodulina (etapa III). A ligação da calmodulina provoca o deslocamento do peptídeo autoinibitório e completa a ativação da calcineurina (etapa IV). Retirado de Li, Rao, Hogan (2011).

A calcineurina ativada promove a desfosforilação de uma série de substratos, incluindo o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), permitindo sua entrada no núcleo da célula. O NFAT nuclear é um componente chave para a estimulação de citocinas, em especial a interleucina 2 (IL-2) que interage com receptores de superfície celular, estimulando assim a proliferação clonal de linfócitos T e outras células do sistema imune (MULERO et al., 2009).

A sequência de eventos moleculares que culmina na transcrição de citocinas de ativação é apresentada na Figura 3. O processo inicia-se com a apresentação de um antígeno ao receptor de células T, localizado na membrana plasmática, ativando-a. A célula T ativada resulta na liberação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O IP3 promove a abertura dos canais de Ca²⁺ no retículo endoplasmático resultando no aumento da concentração intracelular com a liberação do estoque de Ca²⁺, essencial para a ativação da calmodulina. O complexo Ca²⁺/Calmodulina ativa a enzima calcineurina. Esta,

por sua vez, promove a desfosforilação da subunidade citoplasmática do NFAT, ou seja, desmascara a sequência de localização nuclear do NFAT, que é então translocado para o núcleo celular. O DAG promove a atividade da proteína quinase C (CPK), a qual resulta na síntese do fator Proteína Ativadora-1 (AP-1). Para a transcrição ótima de uma série de genes, o NFAT nuclear liga-se cooperativamente a AP-1, resultando na transcrição de citocinas de ativação, tais como IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF, dentre outras (COPE, 2002; NGHIEM, PEARSON, LANGLEY, 2002; PRESCOTT et al., 2012).



Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização da calcineurina. PLC- γ – fosfolipase C; IP3 – inositol 1,4,5-trifosfato; CaM – calmodulina; DAG – diacilglicerol; CPK – proteína quinase C; NFAT – fator nuclear de células T ativadas; AP-1 - Proteína ativadora 1; IL-2 – interleucina-2; IL-4 – interleucina-4; IFN- γ – interferon-gama; TNF – fator de necrose tumoral. Retirado e adaptado de Cope (2002).

Trabalhos da literatura demonstram que doses clinicamente relevantes de radiação UVA-1 suprimem drasticamente e de modo dose-dependente a atividade da calcineurina cuja ação assemelha-se a inibidores de Cn (CnI), como o inibidor ciclosporina A. A inativação da Cn, proporcionada pela radiação UVA-1, mostrou seletividade uma vez que, os efeitos inibitórios foram muito mais proeminentes para a Cn que para a lactato desidrogenase (LDH). Essa inibição da Cn pode resultar em: i) danos oxidativos para a própria enzima (alterações no centro ativo, nas demais regiões e resíduos, acompanhada de mudanças conformacionais), ii) imparidade em grandes números de processos celulares sendo que muitos são plausíveis
contribuidores para o surgimento de tumores (MUSSON et al., 2011; SMIT et al., 2010; MUSSON, MULLENDERS, SMIT, 2012).

A ação conjunta de todos esses processos relacionados à RUV resulta nos efeitos biológicos fotocarcinogênese, fotoimunosupressão, fotoenvelhecimento, queimaduras solares/eritema e fotoalergia (TOSATO et al., 2015).

Diante dos efeitos prejudiciais à pele humana e a excessiva exposição à RUV, as medidas de prevenção recomendadas incluem evitar a exposição ao sol, especialmente nos horário de maior incidência de radiação UV (entre 10h e 16h); fazer uso de roupas e acessórios adequados, tais como chapéus de abas largas, bonés, camisas de mangas compridas e óculos de sol e, principalmente, utilizar protetores solares de amplo espectro com reaplicação (WHO, 1994; MAHÉ et al., 2011; PESCIA et al., 2012; MARTO et al., 2016). Sendo que o uso de protetor solar tem sido fortemente recomendado por organizações de saúde como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e comunidades científicas (OLIVEIRA et al., 2015).

Os protetores solares são formulações de uso tópico, constituídas de filtros UV que precisam ser química e fotoquimicamente estáveis. Caso não sejam, sob ação da radiação solar, as suas ligações químicas podem ser rearranjadas levando a formação de novas moléculas, com menor poder de absorção da radiação UV, ou mesmo com absorção anulada, e suas propriedades toxicológicas podem ser alteradas, diminuindo a segurança destes produtos. Os protetores solares são constituídos de uma mistura de filtros orgânicos que absorvem as radiações UVA e UVB em todo o seu espectro e de filtros inorgânicos que atuam por reflexão, absorção e/ou dispersão da luz solar. Os filtros orgânicos são moléculas com estrutura aromática simples ou múltipla, comumente conjugadas com diferentes grupos químicos (carbonila, ligações duplas, etc). Os filtros inorgânicos são representados pelos óxidos, ZnO e TiO₂, e são apresentados na forma de nanopartículas ultrafinas ou micronizadas garantido a melhor dispersibilidade da RUV e maior transparência sobre a pele. O espalhamento e a absorção da radiação são determinados pelo índice de refração, pelo tamanho da partícula, pela dispersão na emulsão e pela espessura do filme que se forma na pele. Os filtros UV são compostos amplamente utilizados em produtos cosméticos como cremes faciais para o dia, produtos pós-barba, maquiagens, batons, xampus e em materiais de embalagens plásticas (SERPONE, DONDI, ALBINI, 2007; KOCKLER et al., 2012; MILLINGTON, OSMOND, McCALL, 2014; VELA-SORIA et al., 2014)

Os primeiros fotoprotetores foram comercializados em 1928, nos Estados Unidos e eram constituídos de uma combinação de salicilato de benzila e cinamato de benzila. Na segunda Guerra Mundial, os soldados utilizaram petrolatum vermelho como medida protetora padrão. Em 1943, o PABA (ácido 4-aminobenzoico) foi oficialmente reconhecido como o primeiro filtro solar com o depósito da patente. Na década de 70, cresceu a utilização de filtros UVB em formulações cosméticas. Os filtros de absorção UVA foram introduzidos em 1979. No entanto, somente com a incorporação das partículas inorgânicas dióxido de titânio (1989) e óxido de zinco (1992) que houve maior eficácia dos protetores contra a radiação UVA (BALOGH et al., 2011; SCHALKA, dos REIS, 2011).

Atualmente, os filtros UV orgânicos e inorgânicos permitidos para uso em protetores solares na União Europeia (Regulation (EC) n^o. 1223/2009), nos Estados Unidos (MANCEBO, HU, WANG, 2014), na Austrália (ARGS, 2012) e no Brasil (RESOLUÇÃO-RDC n^o 69, 2016) estão descritos na Tabela 1. Suas concentrações máximas empregadas variam de 0,1% a 15,0% (p/p) para filtros orgânicos e para filtros inorgânicos, as concentrações máximas podem atingir até 25,0%.

Filtros UV – INCI	União Europeia	Estados Unidos	Austrália	Brasil
3-Benzylidene camphor	2%			2%
4-Metylbenzylidene camphor	4%		4%	4%
Benzophenone-3	10%	6%	10%	10%
Benzophenone-4	5% *	10%	10%	10% *
Benzophenone-5	5% *		10%	5% *
Benzophenone-8	10%	3%	3%	3%
Benzylidene camphor sulfonic acid	6% *		6%	6% *
Bis-ethylhexyloxyphenol			10%	10%
methoxyphenol triazine				
Butyl methoxy dibenzoylmethane	5%	3%	5%	5%
Camphor benzalkonium	6%		6%	6%
methosulfate				
Cinoxate		3%	6%	3%
Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl	10%		10%	10%
benzoate				
Diethylhexyl butamido triazone	10%			10%
Disodium phenyl dibenzimidazole	10% *		10%	10% *
tetrasulfonate				
Drometrizole trisiloxane	15%		15%	15%
Ethylhexyl dimethyl PABA	8%	8%	8%	8%
Ethylhexyl methoxycinnamate	10%	7,5%	10%	10%
Ethylhexyl salicylate	5%	5%	5%	5%
Ethylhexyl triazone	5%		5%	5%
Homosalate	10%	15%	15%	15%
Isoamyl p-methoxycinnamate	10%		10%	10%
Menthyl anthranilate		5%	5%	5%
Methylene bis-benzotriazolyl	10%		10%	10%
tetramethylbutylphenol				
Octocrylene	10% *	10%	10%	10% *
PABA	5%	15%		15%
PEG-25 PABA	10%		10%	10%
Phenylbenzimidazole sulfonic acid	8% *	4%	4%	8% *
Polyacrylamisomethyl benzylidene	6%			6%
camphor				4.0.0.4
Polysilicone-15	10%		10%	10%
TEA-salicylate		12%	12%	12%
Terephthalylidene dicamphor	10% *		10%	10% *
sulfonic acid				
Titanium dioxide**	25%	25%	25%	25%

Tabela 1 - Lista de filtros UV orgânicos e inorgânicos permitidos para uso em protetores solares de acordo com a regulamentação de cada um dos países citados na tabela.

			Introdução	
Zinc oxide**		25%	Não tem limite	25%
TOTAL DE FILTROS UV	28	16	29	33
INCI: International Nomenclature Cosmetic	Ingredient			

INCI: International Nomenclature Cosmetic Ingredient

*Expresso como ácido

**Filtros físicos/inorgânicos

O protetor solar ideal deve ser fotoestável; deve possibilitar a dissipação da energia absorvida de modo eficiente por vias fotofísicas e fotoquímicas evitando a formação de oxigênio singleto, demais EROs e outros intermediários reativos; não deve penetrar na pele pois pode causar reações cutâneas como dermatites, reações fototóxicas não-imunológicas, alergias e reações fotoalérgicas; deve ser capaz de bloquear os raios UVA e UVB que também podem comprometer o DNA celular e deve ser seguro tanto para o ser humano que aplica o produto em toda a extensão da pele quanto para o ambiente que é o receptor final das substâncias (SERPONE, DONDI, ALBINI, 2007; PESCIA et al., 2012; GILABERTE, GONZÁLEZ, 2010; CURSINO et al., 2013).

Para formular um protetor solar é necessário o estabelecimento de metas de design do produto (tipo, forma, FPS, função adicional, custo e período de comercialização do produto), a seleção do sistema de filtros solares/princípios ativos; a seleção/formulação do veículo e a otimização do produto (testes de eficácia, avaliações sensoriais, estabilidade física e química, segurança). Mas para garantir a eficácia do protetor é preciso que haja conformidade na utilização do produto, ou seja, uso da quantidade recomendada (2 mg/cm², segundo a COLIPA) com aplicação uniforme (dose) e regularidade na aplicação (frequência). Assim, a adesão torna-se a etapa chave para a efetiva proteção solar (TANNER, 2006).

Além da combinação de filtros UV, um protetor solar é constituído de uma mistura de excipientes/veículos e pode apresentar também componentes antioxidantes. Muitas vezes, o veículo determina a eficácia do produto fotoprotetor, mantém a fotoestabilidade dos filtros UV e determina a durabilidade e a resistência a água do protetor solar. O tipo de veículo (loção, creme, gel-creme, spray) também está relacionado a aceitabilidade, padrão de aplicação e conformidade do produto, onde a opacidade de filtros inorgânicos e a oleosidade de filtros orgânicos contribuem para uma aplicação inadequada, reaplicação infrequente e redução da eficácia (SAMBANDAN, RATNER, 2011).

Após a fase de desenvolvimento de um produto fotoprotetor deve-se avaliar sua eficiência. A medida mais empregada para a avaliação da eficácia dos protetores solares é a determinação do FPS, a qual avalia quantitativamente o grau de proteção fornecido por um

protetor solar contra os efeitos da luz UV (PELIZZO et al., 2012; SCHALKA, dos REIS, 2011).

As metodologias de determinação do fator de proteção seguem as normas nacionais das organizações de padronização, como o FDA ou a Organização Internacional de Normatização (ISO) (OLIVEIRA et al., 2015). Sendo que, essas metodologias fazem parte da regulamentação dos protetores solares que diferem, dependendo do país e/ou dos requerimentos da agência regulatória. Mas de forma geral, a regulamentação inclui uma lista dos filtros UV aprovados, a rotulação adequada dos fotoprotetores e os requisitos necessários para a medição do FPS, do FP-UVA e da resistência a água (KOCKLER et al., 2012).

Em países como a Austrália, a maioria dos protetores solares são listados como medicamento, segundo o "Therapeutics Goods Act". Nos EUA, os fotoprotetores são considerados medicamentos isentos de prescrição (OTC, do inglês *Over The Counter*) e estão sob a supervisão da FDA (Federal Drug Administration). Na Europa, os filtros solares são considerados cosméticos e a COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) é a associação responsável por desenvolver padrões industriais de testes, rotulagem e educação ao consumidor (KOCKLER et al., 2012).

O método oficial de análise do FPS é baseado em testes *in vivo* que medem a proteção contra a formação de eritema/queimaduras solares, resposta biológica produzida primariamente pela radiação UVA-2 e UVB. Mas o valor de FPS não confere nenhuma proteção contra os raios UVA-1 (PELIZZO et al., 2012; SCHALKA, dos REIS, 2011).

O protocolo padrão de avaliação do FPS é realizado pela exposição de áreas protegidas e não protegidas da pele de voluntários humanos à luz solar artificial. Sendo assim, o valor de FPS é definido como a razão entre a quantidade de energia (dose eritematosa mínima – DEM) necessária para promover a primeira reação eritematosa na pele protegida pelo protetor solar e a quantidade de energia (DEM) responsável por causar a mesma resposta eritematosa na pele desprotegida, conforme ISO 24444:2010 (BALOGH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Diante da ineficácia de avaliação da proteção UVA-1 pelo método FPS, outros parâmetros de proteção *in vivo* têm sido propostos para avaliação UVA como: i) *Immediate Pigment Darkening* (IPD) que corresponde a dose mínima necessária para produzir escurecimento da pele com margens bem definidas, visualizada logo após a exposição e também é caracterizada por reação transitória e secundária ao processo de fotooxidação da melanina existente nos melanossomas; ii) *Persistent Pigment Darkening* (PPD), reação da pele cujo ponto final é a pigmentação máxima atingida após 2-4 horas de exposição e FP-

UVA baseia-se nas respostas eritematosas mínimas e na pigmentação persistente induzida por UVA (PELIZZO et al., 2012; SKLAR et al., 2013).

Os métodos *in vivo* são procedimentos tediosos e demorados, baseados em respostas da pele que não estão relacionados a tumorigênese e também são considerados invasivos por expor voluntários humanos à doses de RUV que podem proporcionar riscos indesejáveis à saúde. Diante disso, métodos alternativos *in vitro* podem ser a solução por serem menos dispendiosos, rápidos e facilmente reprodutíveis rotineiramente, não envolverem questões éticas como nos testes *in vivo* (HUPEL, POUPART, GALL, 2011; de PAULA et al., 2012; PELIZZO et al., 2012; BACQUEVILLE et al., 2015) e podem contribuir com respostas úteis e complementares para o screening de formulações (VELASCO et al., 2011; BACQUEVILLE et al., 2015).

Geralmente, os testes *in vitro* reportados na literatura consistem na aplicação de uma fina camada de protetor solar sobre um substrato o qual é analisado por um espectrofotômetro que determina a quantidade de RUV que passa através do filme formado pelo fotoprotetor. Na espectroscopia de transmissão, o protetor solar também é colocado sobre um substrato e sua transmissão espectral é medida antes e após a exposição a uma fonte de RUV (PELIZZO et al., 2012).

Os substratos empregados nos testes mencionados devem apresentar características físicas que assemelhem a pele, sendo que, os mais empregados são: i) fita cirúrgica Transpore[®] de fácil aquisição, baixo custo, atualmente pouco utilizada, mas normalmente manuseada como suporte em placas de quartzo lisa para aplicação do fotoprotetor; ii) Vitro-skin[®] (IMS Inc.) é um substrato de pele sintética que deve ser submetido a um processo de hidratação antes do uso, possibilita bons resultados em testes de proteção solar mas apresenta desvantagens como o elevado custo, a necessidade de hidratação e a redução do tempo de vida da amostra hidratada; iii) placa de quartzo áspera com ampla aplicação devido a sua elevada transmitância UV, pode ser reutilizada após processo de limpeza, porém apresenta alto custo; iv) placas de PMMA (polimetilmetacrilato) de fácil manuseio, podem ser fornecidas com rugosidade reprodutível sendo considerada uma opção na indústria para os testes *in vitro* no UVA; v) PTFE (teflon) amplamente usado para aplicação UV devido a boa transmitância e suas propriedades Lambertianas, são submetidas a um processo de lixagem para obter superfícies rugosas (PELIZZO et al., 2012).

Porém, vários fatores interferem na análise espectrofotométrica como a composição dos filtros, a qualidade do espectrofotômetro, o tipo de substrato utilizado, a quantidade de protetor solar aplicada e o modo de espalhabilidade (PELIZZO et al., 2012).

Outro método *in vitro* corresponde a determinação do FPS pela leitura espectrofotométrica de soluções diluídas dos protetores solares, também conhecido como Método de Mansur. A desvantagem desse método está na sua aplicação para filtros solares solúveis a um dos solventes utilizado no ensaio (metanol, isopropanol ou etanol), não sendo capaz de avaliar a proteção proporcionada pela presença de filtros inorgânicos, insolúveis aos solventes empregados (VELASCO et al., 2011).

Mais uma metodologia *in vitro* que pode ser utilizada para avaliação de protetores solares baseia-se no uso de culturas celulares. Uma vez que, esta é uma importante ferramenta para a investigação de alterações específicas induzidas pela radiação UV que ocorrem em nível celular e molecular (CAYROL et al., 1999; BRIGANTI; PICARDO, 2003; BACQUEVILLE et al., 2015).

Entre essas alterações pode-se citar: i) a depleção de antioxidantes endógenos como: superóxido dismutase (SOD) (VILELA et al., 2012), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutationa reduzida (GSH) (STEENVOORDEN, van HENEGOUWEN, 1997); ii) o aumento da peroxidação lipídica (BRIGANTI, PICARDO, 2003); iii) a indução de vias específicas de transdução de sinais que modulam processos inflamatórios, imunossupressivos e apoptóticos da pele (RAMACHANDRAN; PRASAD; KARTHIKEYAN, 2010; ZANCHETTA et al., 2010); a inativação de enzimas chave do sistema imune como a calcineurina (SMIT et al., 2010); a viabilidade celular (FIGUEIREDO et al., 2014), dentre outras. Assim, esses tipos de alterações biológicas em células cutâneas podem ser utilizadas como parâmetros para a avaliação do efeito fotoprotetor durante a fase de pesquisa e desenvolvimento de protetores solares (BACQUEVILLE et al., 2015). Podendo assim, atuar como um método *in vitro* de screening permitindo a seleção de formulações com resultados promissores para dar continuidade aos estudos posteriores pré-clínico e clínico.

	16
 Introdução	

17
 Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar ensaios *in vitro* usando culturas de células imortalizadas e primárias para avaliar a eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de análise as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB.

2.2 Objetivos específicos

 ✓ Selecionar marcas diferentes de protetores solares comerciais baseada na composição de filtros UVA;

✓ Confirmar a composição de filtros UV orgânicos mencionados no rótulo de cada protetor solar pela técnica de CLAE;

 ✓ Realizar a qualificação de desempenho do sistema de Irradiação Bio-Espectra-3 a ser utilizado;

✓ Estabelecer as doses das radiações UVA e UVB que induzem as maiores alterações aos parâmetros biológicos: viabilidade celular, peroxidação lipídica e/ou formação de EROs, nas linhagens celulares L929 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos);

✓ Avaliar se as doses das radiações UVA e UVB estabelecidas e se os parâmetros biológicos escolhidos permitirão estabelecer a melhor relação dose-resposta entre as medidas desses parâmetros e os diferentes fatores de proteção dos protetores solares selecionados;

✓ Validar os ensaios *in vitro* para medida da eficácia de protetores solares pelos parâmetros seletividade, precisão interdia e exatidão;

✓ Desenvolver ensaio *in ivtro* usando a atividade enzimática da calcineurina como marcador biológico para avaliar a eficácia de protetores solares comerciais expostos à radiação UVA-1;

 \checkmark Estabelecer as condições ideais de quantificação do fosfato em escala micro usando o reagente de verde de malaquita para medida da atividade enzimática da calcineurina;

✓ Estabelecer as condições ideais de medida da atividade da calcineurina em lisados de células primárias de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn).

 ✓ Avaliar a existência de uma relação linear entre a diminuição da atividade da calcineurina e a quantidade de radiação UVA-1;

✓ Avaliar se a dose de radiação UVA-1 e as condições de medida da atividade enzimática da calcineurina estabelecidas permitirão diferenciar a eficácia fotoprotetora de protetores solares com diferentes filtros UVA;

✓ Avaliar o ensaio de avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares usando a medida da atividade da calcineurina pelo parâmetro precisão inter-dia.

3. Material e Métodos

3.1 Protetores solares comerciais

Protetores solares comerciais de duas empresas (A e B) foram selecionados para serem utilizados no desenvolvimento de novos ensaios *in vitro* de avaliação de eficácia de formulações fotoprotetoras. Estas formulações foram adquiridas no mercado local (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

A escolha por trabalhar com formulações comerciais foi por apresentarem valores de fator de proteção solar diferentes determinados por ensaios *in vivo* (FPS e/ou PPD) e descritos na embalagem. Os diferentes valores de FPS e/ou PPD devem-se as diferenças em composição de filtros UV e aos veículos empregados na incorporação dos ativos.

Os protetores solares da marca A estão disponibilizados comercialmente em loções, com valores de FPSs de 15, 30 e 60, tal como descrito nos rótulos dos produtos. Essas formulações consistem de uma mistura de filtros UV orgânicos e inorgânico (Tabela 2).

Protetor Solar – Marca A		Pro	Protetor Solar – Marca B		
FPS	Filtros	Região de	FPS/PPD	Filtros	Região de
	Orgânico/	absorção UV		Orgânico/	absorção UV
	inorgânico			inorgânico	
	EHT	UVB, UVA-2		EHT	UVB, UVA-2
	OCT	UVB		OCT	UVB
	TiO ₂ *	UVB, UVA-2		TiO ₂ *	UVB, UVA-2
	BEMT	UVB, UVA-2		BEMT	UVB, UVA-2
15	AVO	UVA-1, UVA-2	30/15	EHS	UVB
				AVO	UVA-1, UVA-2
				HMS	UVB
				DTS	UVA-1, UVA-2
				TDSA	UVA-1, UVA-2
	EHT	UVB, UVA-2		EHT	UVB, UVA-2
	OCT	UVB		OCT	UVB
30	TiO ₂ *	UVB, UVA-2	40/25	TiO ₂ *	UVB, UVA-2
	BEMT	UVB, UVA-2		BEMT	UVB, UVA-2
	AVO	UVA-1, UVA-2		AVO	UVA-1, UVA-2
				DTS	UVA-1, UVA-2
				TDSA	UVA-1, UVA-2
	EHT	UVB, UVA-2		EHT	UVB, UVA-2
	OCT	UVB		OCT	UVB
	TiO ₂ *	UVB, UVA-2		TiO ₂ *	UVB, UVA-2
60	BEMT	UVB, UVA-2	60/41	BEMT	UVB, UVA-2
	EHS	UVB		AVO	UVA-1, UVA-2
	AVO	UVA-1, UVA-2		DTS	UVA-1, UVA-2
				TDSA	UVA-1, UVA-2

Tabela 2 – Composição de filtros UV, orgânicos e inorgânicos, presentes nos protetores solares comerciais das marcas A e B e seus respectivos valores de fator de proteção solar.

FPS: Fator de Proteção Solar; PPD: do inglês, Persistent Pigment Darkening; EHT: Ethylhexyl triazone; OCT: Octocrylene; TiO_2^* : Titanium dioxide; BEMT: Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazone; EHS: Ethylhexyl salicylate; AVO: Avobenzone; HMS: Homosalate; DTS: Drometrizole trisiloxane; TDSA: Terephthalydene dicamphor sulfonic acid. *Filtro Inorgânico.

De acordo com os rótulos dos produtos da empresa B, os protetores solares eram compostos de filtros UV orgânicos e inorgânico com FPSs de 30, 40 e 60, e que diferiam dos protetores da marca A por apresentarem, também, valores de PPDs (15, 25 e 41, respectivamente). Os valores de PPDs, determinados pela empresa B, estão associados à presença de filtros orgânicos que absorvem a radiação UV na faixa de absorção UVA-1 e UVA-2 que são exclusivos da marca (Tabela 2).

3.1.1 Confirmação da presença dos filtros orgânicos descritos na composição dos protetores solares comerciais por CLAE

A presença dos filtros orgânicos, mencionados nos rótulos dos protetores solares das marcas A e B, foi confirmada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a determinação dos perfis cromatográficos, os filtros orgânicos foram extraídos de alíquotas dos protetores solares comerciais por extração líquido-líquido.

3.1.1.1 Processo de extração e recuperação dos filtros orgânicos

Alíquotas de 20 mg dos protetores solares comerciais foram submetidas à extração líquido-líquido empregando uma mistura de solventes. Para os produtos da empresa A, a mistura consistiu de 40 mL de metanol:água (1:1, v/v) e 40 mL de diclorometano. Enquanto que, para os fotoprotetores da empresa B, utilizou-se 40 mL de metanol:água (1:1, v/v) e 80 mL de diclorometano. Após dispersão manual do produto nas misturas de solventes, a dispersão foi submetida à agitação em banho ultrassônico de 20 minutos (adaptado de MANOVÁ et al., 2013 e CHISVERT et al., 2013). As fases orgânica (diclorometano) e aquosa (metanol e água) após separação em funil de separação foram recolhidas e submetidas à análise cromatográfica por CLAE (Figura 4).



Figura 4 – Representação do processo de extração dos filtros orgânicos UV dos protetores solares comerciais (marcas A e B).

*Fonte da figura: http://protejasuapele.com.br/voce-sabe-qual-a-diferenca-entre-protetor-e-bloqueador-solar ** Fonte da Figura: http://pixshark.com/erlenmeyer-flask-drawing.htm

*** Fonte da Figura: http://www.unique.ind.br/usc1600inox.html

****Fonte da Figura: http://www.ebah.com.br/content/ABAAAe2OIAG/extracao-solventes

***** Fonte da Figura: http://www.ebah.com.br/content/ABAAAeiicAC/relatorio-separacao-extracao-reativa-pf-recristalizacao-cromatografia#

A avaliação da recuperação do processo extrativo foi realizada pelo método de adição de padrão. Soluções de três filtros orgânicos, benzofenona-3; avobenzona e octocrileno da marca Sigma-Aldrich[®], nas concentrações de 2 mg/mL, 1 mg/mL e 1 mg/mL, respecitvamente, foram preparadas em etanol PA. Amostras de 20 mg dos protetores solares das marcas A e B foram adicionadas de 1 mL de cada solução padrão dos filtros UV (protetores solares adicionados de padrões), 20 mg dos protetores solares não adicionadas dos filtros UV padrões (protetores solares não adicionados) e a mistura de 1 mL de cada solução padrão des filtros UV, foram todas submetidas ao mesmo procedimento de extração descrito no parágrafo anterior.

As respectivas frações orgânicas dos protetores solares das marcas A e B adicionadas ou não dos filtros UV padrões e as frações orgânicas da extração da mistura de filtros UV foram diluídas 10 (Marca A) e 5 (Marca B) vezes usando o diclorometano como solvente. As frações diluídas foram submetidas a análise espectrofotométrica na faixa de 280 a 400 nm. As áreas sob as curvas (ASC) que foram calculadas pela somatória das absorvâncias obtidas na faixa de 280 a 400 nm foram aplicadas na Equação 1, para o cálculo do percentual de recuperação.

Equação 1:

$$R(\%) = \left(\frac{ASC_{PS+PF} - ASC_{PS}}{ASC_{PF}}\right) \times 100$$

Onde: R (%): corresponde ao percentual de recuperação obtido;

ASC_{PS+PF}: Área sob a curva dos protetores solares comerciais (PS) adicionados da mistura dos padrões de filtros (PF);

ASC_{PS}: Área sob a curva dos protetores solares comerciais (PS) na ausência de padrões de filtros;

ASC_{PF}: Área sob a curva da mistura de padrões filtros (PF).

3.1.1.2 Perfil cromatográfico

As frações orgânica e aquosa, obtidas no processo de extração dos protetores solares comerciais, e os padrões dos filtros UV foram analisados por CLAE.

Alíquotas de 20 µL tanto dos padrões de filtros orgânicos (Sigma-Aldrich, EUA) quanto das frações das amostras de protetores solares foram injetadas em cromatógrafo à líquido Shimadzu (Modelo LC-10AT, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna C-18 Hypersil Gold (250 mm L x 4,6 mm DI, partículas de 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplada a uma pré-coluna C-18 (10 mm x 4 mm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EUA). O processo de eluição ocorreu com uma programação por gradiente cuja taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min a 22°C, com uma fase móvel (FM) constituída de (A) etanol PA (J.T.Baker[®], Phillipsburg, Nova Jersey) e (B) água acidificada com 1% de ácido fórmico (J.T.Baker[®],

Phillipsburg, Nova Jersey). A programação por gradiente consistiu em: 0-5 min (55:45), 5-15 min (60:40), 15-20 min (80:20), 20-35 min (100:0), 35-40 min (80:20), 40-45 min (60:40), 45-50 min (55:45) e 50-51 min (STOP) e a monitoração dos perfis foi realizada a 313 nm (CHISVERT, TARAZONA, SALVADOR, 2013 – com modificações).

3.2 Desenvolvimento de ensaios *in vitro* para avaliação do potencial fotoprotetor de protetores solares usando cultura de células

Os estudos realizados para o desenvolvimento de ensaios *in vitro* foram iniciados pela busca das linhagens celulares mais adequadas e pela escolha das alterações induzidas pela ação da radiação UV às celulas que pudessem servir de parâmetros mensuráveis para avaliar o potencial fotoprotetor de protetores solares (LEBONVALLET et al., 2010). Assim, foram testadas linhagens de células imortalizadas e, como alterações celulares induzidas pela radiação UV: a perda da viabilidade celular, o aumento da peroxidação lipídica e o aumento da formação de EROs.

3.2.1 Fonte de Radiação UVA e UVB

Para a irradiação UVA e UVB foi utilizada o Sistema Bio-Espectra-3 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França), equipado com lâmpadas UVA com espectro de emissão de 320-400 nm, atingindo o pico máximo em 350 nm (Figura 5A) e lâmpadas UVB com espectro de emissão de 280-320 nm, com pico máximo em 309 nm (Figura 5B). Este equipamento funciona em três modos de irradiação: somente UVA, somente UVB ou ambas radiações, apresenta sensor fotoelétrico de silício para monitoramento das doses emitidas, programação do tempo de irradiação/dose, temperatura do processo controlada (não excede 30°C) e sistema de ventilação interno para evitar superaquecimento do aparelho.



Figura 5 – Espectro de emissão das lâmpadas ultravioletas empregadas no estudo: (A) lâmpada UVA com espectro de emissão de 320-400 nm e pico máximo em 350 nm; (B) lâmpada UVB com espectro de emissão de 280-320 nm e pico máximo em 309 nm.

3.2.1.1 Qualificação de desempenho do sistema de irradiação UV

A necessidade em estabelecer o bom desempenho do sistema de irradiação na região de UVA e UVB e, consequentemente, uma boa performance nos experimentos em culturas celulares, fez com que o sistema de irradiação UV foi qualificado utilizando alguns parâmetros críticos de funcionalidade do equipamento.

A) <u>Definição da posição das microplacas sobre a bandeja usando a medida de radiação</u> <u>emitida pelas lâmpadas UVA e UVB</u>

A fonte de luz UV do equipamento (Figura 6A) foi programada para emissão de uma dose de radiação UVA e de radiação UVB. A quantidade de radiação emitida pelas lâmpadas foi medida pelo radiômetro fixo do equipamento que está localizado no centro da bandeja. Para avaliar se a radiação emitida pelas lâmpadas é de mesma intensidade em toda extensão da bandeja do equipamento, um radiômetro móvel (Mod. VLX-3.W, Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França) foi posicionado em diferentes distâncias em relação ao radiômetro fixo do equipamento e a dose de radiação emitida foi medida pelo radiômetro móvel e comparada com aquela medida pelo radiômetro fixo.

O radiômetro móvel foi posicionado à esqueda e à direita do radiômetro fixo a diferentes distâncias entre 9,0 a 53,0 cm, como também a 7,5 e 9,0 cm a cima e a baixo deste radiômetro, como demonstrado na Figura 6B. As medidas foram feitas em triplicata.



Figura 6 – Representação esquemática do Sistema de Irradiação UV: (A) equipamento completo com as especificações de seus componentes, adaptado de FORTE (2012); (B) bandeja móvel do equipamento representado na Figura A com as microplacas dispostas em diferentes posições do radiômetro fixo localizado no ponto central do aparelho, arte elaborada pela autora.

B) Distância entre a bandeja e as lâmpadas fluorescentes

A bandeja do sistema de irradiação é móvel e pode ser posicionada a qualquer distância da fonte luminosa. Para estabelecer a distância ideal entre a bandeja e a fonte de irradiação, células da linhagem L929 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos) foram posicionadas a uma distância de 12 cm e 20 cm das lâmpadas, como representado na Figura 5A. Para avaliar o efeito da distância da fonte de irrradiação sobre as células, a quantidade de EROs gerada e a viabilidade celular foram medidas quando as células foram expostas às radiações UVA e UVB, respectivamente.

C) <u>Equipamento de irradiação protegido ou não da incidência de luz ambiente</u>

O aparelho de irradiação foi instalado em uma sala que permite que este receba luz do ambiente que poderia interferir nas respostas dos parâmetros biológicos. Para analisar a influência da fonte de luz externa, o equipamento foi protegido ou não por um plástico negro e os parâmetros biológicos mencionados no item anterior (B), relacionados tanto a incidência de radiação UVA quanto de UVB, foram quantificados.

3.2.2. Desenvolvimento de ensaios in vitro para avaliação da eficácia fotoprotetora

3.2.2.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares usadas neste estudo (L929 – fibroblastos de camundongos e HaCaT – queratinócitos de humanos) representam células das camadas dérmica e epidérmica da pele e foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Ambas culturas foram cultivadas em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco[®]) com alta glicose, suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco[®]) e com soluções de penicilina (100 U/mL, Sigma-Aldrich, EUA), estreptomicina (0,10 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (0,25 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). Foram mantidas em incubadora a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂.

Para irradiação, as duas linhagens de células (L929 e HaCaT), entre a terceira e oitava passagens do ciclo celular, foram semeadas em microplacas de 6 poços a uma confluência de 8 x 10⁵ células/poço e mantidas em incubadora por 12 horas. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 2 mL de solução salina balanceada de Hank (HBSS, do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*), as microplacas foram cobertas com uma placa de quartzo, e seguida pela aplicação de amostras de 2 mg/cm² de protetores solares sob essa placa. O conjunto microplaca/placa de quartzo foi submetido a diferentes doses de radiação UVA e UVB (Figura 7) (FIGUEIREDO et al., 2014), utilizando o sistema de irradiação Bio-Espectra-3 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França).



Figura 7 – Procedimento de irradiação das culturas de células L929 (fibroblastos) e HaCaT (queratinócitos) à diferentes doses de radiação UVA e UVB. Adaptado de Figueiredo et al. (2014).

3.2.2.2. Parâmetros biológicos empregados na avaliação da eficácia fotoprotetora

3.2.2.1. Viabilidade Celular

Nas culturas de células irradiadas, como mencionado no *item 3.2.2.1*, o tampão de Hank foi removido e substituído por 2 mL de meio DMEM suplementado com 2% de SBF. As microplacas foram então re-incubadas na incubadora com 5% de CO₂ a 37°C (VIELHABER et al., 2006). Após 48 horas de re-incubação, o meio de cultura foi removido e as culturas de células lavadas com solução salina (0,90% NaCl). Em seguida, foram adicionados 200 μ L de uma solução aquosa de 0,01% de resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) e 1,80 mL de meio DMEM adicionado de 10% de SBF. As microplacas foram subsequentemente incubadas a 37°C durante 4 horas e posteriormente, a fluorescência emitida foi medida em fluorímetro de placas (BioTek Synergy 2 - multi-modo leitor de microplacas, BioTek Instruments Inc., EUA) utilizando um comprimento de onda de excitação de 540 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm (KUETE et al., 2013).

Os resultados foram expressos em percentual de células viáveis, sendo as células não irradiadas/não-protegidas por protetor solar consideradas como 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três dias diferentes (n = 9).

3.2.2.2.2. Peroxidação Lipídica

Após a irradiação, como descrita no *item 3.2.2.1*, as células irradiadas em tampão de Hank foram desprendidas da microplaca por raspagem utilizando um suporte plástico (raspador de células, TPP Techno Plastic Products AG, Alemanha), obtendo-se assim uma suspensão celular, que foi congelada a -20°C. No dia do experimento, as suspensões foram descongeladas a 40°C e lisadas por três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 40°C. Uma alíquota da suspensão de células lisadas foi armazenada para a determinação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Alíquotas de 900 μ L de cada suspensão de células lisadas foram transferidas para tubos de ensaio, e adicionou-se 1 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA - J.T.Baker[®], Phillipsburg, Nova Jersey) a 0,375% (p/v) em ácido clorídrico (HCl) 0,250 M contendo 15% de ácido tricloroacético (TCA – Synth, Diadema, SP, Brasil) (p/v). A mistura foi então aquecida a 80°C durante 15 minutos e arrefecida em gelo. A seguir, 2 mL de *n*-

butanol (Dinâmica Química Contenporânea Ltda, Diadema, SP, Brasil) foram adicionados à mistura para extração do complexo malondialdeído - ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) formado. Após agitação e centrifugação da mistura, a fase orgânica foi recolhida e analisada em espectrometria de fluorescência (BioTek Synergy 2 - leitor de microplacas multi-modo, BioTek Instruments Inc., EUA) sob um comprimento de onda de excitação de 515 nm e de emissão de 550 nm (MORLIÈRE et al., 1991).

Os resultados foram expressos como a quantidade de MDA normalizada para o conteúdo de proteína (nM/pg de proteína) e a curva padrão foi preparada usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, EUA), composto que libera quantitativamente os adutos do complexo MDA-TBA sob as mesmas condições experimentais. Cada determinação foi realizada em triplicata e em três dias diferentes (n = 9).

3.2.2.3 EROs intracelulares

As culturas celulares (L929 e HaCaT) foram submetidas à radiação UVA, como indicado no *item 3.2.2.1*. Após o processo de irradiação, ambas as células foram incubadas a 37° C com uma solução de tampão de Hank contendo 5 μ M da sonda 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA, Sigma-Aldrich, EUA) por 30 minutos. Ao término da incubação, a intensidade de fluoresceína foi medida utilizando um fluorímetro de placas (BioTek Synergy 2 multi-modo leitor de microplacas, Biotek Instruments Inc., EUA) a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 528 nm (WANG, JOSEPH, 1999). Os experimentos foram executados em triplicata e em três dias diferentes (n=9).

3.2.2.3. Validação dos ensaios in vitro

A validação dos ensaios *in vitro* foi realizada pela determinação dos parâmetros seletividade, precisão inter-dia e exatidão.

A) Seletividade

A seletividade dos ensaios *in vitro* de medida da viabilidade celular e de formação de EROs para avaliar a eficiência dos protetores solares contra a radiação UVB e UVA, respectivamente, foi demonstrada usando os extratos etanólico de *Garcinia brasiliensis* nas concentrações de 2%, 5% e 10% e da Astaxantina nas concentrações de 2% e 5%. O extrato

de *G. brasiliensis* absorve na região do UVB enquato que a astaxantina na região do UVA, como demonstrado na Figura 8A e 8B, respectivamente. Dispersões destes extratos foram aplicadas na placa de quartzo (2 mg/cm²) e utilizadas para proteger as células L929 e as células HaCaT contra as radiações UVB e UVA, respectivamente, e a eficiência fotoprotetora foi avaliada por medida da viabilidade celular e da quantidade de EROs formada.



Figura 8 – Espectros de absorção na região do UV/Visível. (A) Extrato etanólico do epicarpo de *Garcinia brasiliensis* na concnetração de 100 μ g/mL. (B) Solução de diclorometano da matéria-prima Astaxantina (Galena[®]) na concentração de 1 mg/mL.

B) Determinação da precisão inter-dia dos ensaios in vitro

A precisão das medidas de viabilidade celular, peroxidação lipídica e da formação de EROs em culturas de células, expostas às radiações UVA e UVB, protegidas ou não pelos protetores solares comerciais com diferentes FPSs e/ou FPSs/PPDs, foi expresssa como o percentual do desvio padrão relativo (DPR, %). As medidas foram realizadas em triplicata por 3 dias consecutivos, usando culturas de células com passagens diferentes do ciclo de crescimento celular (entre a 3ª e 8ª passagens).

C) Determinação da exatidão dos ensaios in vitro

Para determinação da exatidão, os dados de medida de viabilidade celular, peroxidação lipídica e formação de EROs, obtidos em células expostas às radiações UVA e UVB e sob proteção de protetores solares com diferentes valores de FPSs ou de PPDs, foram relacionados aos respectivos valores de FPSs ou PPDs marcados no rótulo. Um gráfico foi construído para cada parâmetro biológico usando os produtos das marcas A e B. Sendo que,

no eixo da ordenada, adicionou os valores médios dos ensaios: viabilidade celular (%), a relação entre nM MDA por proteína (pg), e quantidade de EROs formada e no eixo da abscissa o logarítimo dos fatores de proteção mencionados no rótulo. Os dados foram tratados pelo método dos mínimos quadrados e as equações de regressão linear foram obtidas. A variável y de cada equação foi substituída pelos valores obtidos para cada *n* dos parâmetros biológicos quando as células foram irradiadas sob a proteção dos protetores solares, obtendo-se desta forma os FPSs e/ou PPDs calculados. Para determinação da exatidão dos ensaios, os valores de FPSs ou de PPDs calculados foram relacionados aos valores de FPSs ou PPDs teóricos, aqueles indicados nos rótulos dos produtos comerciais, que foram considerados como valor de referência 100%.

3.2.2.4. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o software OriginPro 7,0 (OriginLab Corporation, EUA). Para a análise dos resultados dos ensaios *in vitro* aplicou-se o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey. Os valores de p < 0,05 mostraram evidências estatísticas de que houve uma diferença entre os tratamentos (protetores solares) e os controles (CNI - controle negativo e CI - controle positivo) em questão, no âmbito do intervalo de confiança de 95%.

3.2.3. Desenvolvimento de ensaio *in vitro* para avaliação de eficácia fotoprotetora de protetores solares na faixa de absorção UVA-1

A eficácia de protetores solares na região de absorção UVA-1 é predominantemente avaliada com testes *in vivo* usando voluntários humanos, conforme os ensaios de IPD e PPD que são baseados nas mudanças de pigmentação imediata ou persistente na pele (MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; PELIZZO et al., 2012).

No entanto, os testes realizados *in vivo* apresentam desvantagens em termos de custos elevados no processo de recrutamento e tratamento dos voluntários, em tempo por serem ensaios demorados e em relação a questões éticas por expor voluntários a doses demasiadas de radiação UVA (PELIZZO et al., 2012; GILLIES et al., 2003; HUPEL, POUPART, GALL, 2011).

Diante desses fatos, há a necessidade de desenvolver ensaios *in vitro* menos dispendiosos e mais seguros, do ponto de vista ético, e que reflitam as reais alterações induzidas pela radiação UVA-1 à pele humana a nível celular e molecular como a inativação da enzima calcineurina que apresenta papel chave na resposta imunológica (SMIT et al., 2008).

Sabe-se que, a enzima calcineurina é uma fosfatase 2B serina/treonina dependente de Ca²⁺/calmodulina. A medida de sua atividade é baseada na detecção de fosfato liberado no processo de desfosforilação de seu substrato, que *in vivo* o principal deles é o fator de transcrição NFAT (do inglês *Nuclear Factor of Activated T cells*) (PRESCOTT et al., 2012) e *in vitro* pode ser o fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado (SELLAR et al, 2006). A atividade da Cn *in vitro* pode ser medida colorimetricamente pela reação do fosfato com o reagente verde de malaquita (VM)

3.2.3.1. Desenvolvimento do ensaio para medida da atividade da calcineurina

3.2.3.1.1. Quantificação de fosfato inorgânico usando o reagente verde de malaquita

A quantidade de fosfato inorgânico liberado na reação enzimática envolvendo a calcineurina é em torno de picomolar (pmol) (FENG et al., 2011). Sabendo que, o reagente verde de malaquita é um corante que permite a detecção colorimétrica do fosfato inorgânico nessa faixa de concentração (SHERWOOD et al., 2013), o seu uso na quantificação de fosfato liberado da reação calcineurina-substrato em microescala, tornou-se indicado.

A técnica empregada para quantificação do fosfato inorgânico em microplaca de 96 poços foi adaptada do ensaio proposto por Baykov, Evtushenko e Avaeva (1988). A adaptação consistiu em reduzir o volume reacional de 500 μ L para 155 μ L, sendo que a proporção dos componentes reacionais utilizados (amostras, solução do reagente verde de malaquita e de água miliQ), foi padronizada.

A. Preparo das soluções de fosfato de potássio

A solução padrão estoque de fosfato consistiu em uma solução de fosfato de potássio (KH₂PO₄, Synth, Diadema, SP, Brasil) na concentração de 13,608 µg/mL, preparada em água miliQ e cujo o sal foi previamente seco em estufa a 110°C, por 4 horas. Esta solução estoque

foi diluída em água mili-Q para obter soluções com concentrações que variaram de 100 a 5000 pmol de fosfato.

B. Preparo do reagente verde de malaquita

O preparo do reagente verde de malaquita foi realizado no dia de execução do ensaio e consistiu na mistura de 2,5 mL de molibdato de amônio a 7,5% (Synth, Diadema, SP, Brasil) em ácido sulfúrico 5 N, 10,0 mL da solução de verde de malaquita (Sigma-Aldrich, EUA) composta de 0,44 g do reagente VM em 360,0 mL de ácido sulfúrico 4 N e 0,2 mL de Nonidet P40 (NP-40, Sigma-Aldrich, EUA) a 11,0%, solubilizado em água mili-Q. Este detergente foi uma alteração ao método proposto por Baykov, Evtushenko e Avaeva (1988).

C. Obtenção da curva de calibração

Variações na proporção dos componentes reacionais foram testadas (Tabela 3), sendo que as concentrações das soluções de fosfato de potássio avaliadas foram mencionadas no *item A*. Após 50 minutos de incubação sob agitação em temperatura ambiente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 620 nm (Synergy 2 Multi-Mode Reader, BioTec Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os dados foram tratados pelo método dos mínimos quadrados, uma curva de regressão linear, relacionando absorvância (620 nm) e concentração de fosfato (pmol), e sua respectiva equação foram obtidos.

Testes/Componentes reacionais	Amostras (µL)	Água (µL)	Solução de verde de malaquita (µL)
Teste 1	50	5	100
Teste 2	50	93	12
Teste 3	50	52,5	52,5

Tabela 3 – Diferentes proporções entre os componentes reacionais analisadas para a quantificação de fosfato inorgânico usando o reagente verde de malaquita.

D. Análise estatística

A análise de regressão linear das concentrações de fosfato que variaram de 100 a 5000 pmol foi realizada usando o software OriginPro 7,0 (OriginLab Corporation, EUA), baseada no trabalho de Gosmaro et al. (2013).

A precisão inter-dia foi determinada pela média de cinco replicatas diárias durante 9 dias e expressa como desvio padrão relativo (DPR, %).

3.2.3.1.2. Determinação das condições reacionais ideais de medida da atividade da calcineurina

Para medir a atividade enzimática da calcineurina *in vitro* foi necessário definir condições reacionais ideais para enzima, como por exemplo a concentração de substrato a ser utilizada, o tempo e a temperatura de reação.

As condições reacionais ideais foram determinadas usando amostras de calcineurina comercial cuja atividade enzimática foi mencionada pelo fornecedor. Para determinação da atividade da calcineurina comercial foi adicionado em microplaca de 96 poços 25 μ L de tampão ensaio 2x/calmodulina (Tabela 4), 10 μ L do substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado, concentração no meio reacional fixada em 7,5 μ M (Tabela 4), quantidades de calcineurina comercial que variaram de 1 a 80 U (Tabela 4) e volumes de água mili-Q qsp (quantidade suficiente para) 55 μ L de volume reacional final. Foi preparado também um branco na ausência de substrato. A reação foi incubada por 30 minutos a 30°C sob agitação e interrompida pela adição de 100 μ L de uma solução de verde de malaquita constituída de 93 μ L de água miliQ e 12 μ L de reagente VM (*item 3.2.3.1.1.B*).

Tabela 4 – Preparo das soluções usadas no meio reacional para medida da atividade da calcineurina comercial.

Soluções Preparo		Informações	
Enzima Calcineurina Comercial	10 μ L de Calcineurina (100 U/ μ L, Enzo Life Science, EUA) foram diluídos em 490 μ L de tampão: 50 mM Tris (pH-7,5); 100 mM NaCl; 6 mM MgCl ₂ ; 5 mM ditiotreitol (DTT, Sigma- Aldrich, EUA); 0,025% NP- 40; 0,5 mM CaCl ₂), atividade final da calcineurina 2 U/ μ L.	Fabricante (Enzo Life Sciences, EUA)	
0,75 mM do substrato fosfopeptídeo RII <i>Serina-</i> fosforilado	0,5 mg do substrato (pSer95, Ala97-RII [81-99], Enzo Life Sciences, EUA) foram solubilizados em 305 µL de água mili-Q.	Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Enzo Life Sciences, EUA)	
Tampão Ensaio 2x	100 mM Tris (pH-7,5); 200 mM NaCl; 12 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,02% NP-40 e 1 mM CaCl ₂ .	Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Enzo Life Sciences, EUA)	
Adição de calmodulina ao tampão ensaio 2x	20 μ L de uma solução 25 μ M de calmodulina (Sigma- Aldrich, EUA) foram solubilizados em 980 μ L de tampão ensaio 2x. 25 μ L dessa mistura foram usados nos ensaios.	Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Enzo Life Sciences, EUA)	

Para o desenvolvimento da coloração, a reação foi agitada por 20 minutos (tempo preconizado por PRESCOTT et al. (2012) e no manual do Calcineurin Cellular Activity Assay Kit, Enzo Life Sciences, EUA) ao abrigo da luz em temperatura ambiente (TA). A medida da absorvância do complexo verde formado entre o reagente verde de malaquita, o molibdato e os íons fosfatos (produto da reação enzimática), foi lida em 620 nm utilizando

espectrofotômetro Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) (Figura 9). As reações foram realizadas em triplicata para cada quantidade de enzima usada.

As condições reacionais utilizadas foram baseadas em informações presentes no manual do Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (Enzo Life Sciences, EUA) e no trabalho desenvolvido por Sellar et al. (2006).



Figura 9 – Representação esquemática da reação enzimática entre a calcineurnina comercial (Lonza[®]) e o substrato sintético fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado (Enzo[®]). Arte elaborada pela autora.

3.2.3.2. Determinação das condições de medida da atividade da calcineurina em lisados de células primárias

3.2.3.2.1. Células primárias e seu cultivo

Para avaliação da atividade da calcineurina utilizou-se fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn, do inglês *Human Dermal Fibroblast, neonatal*), adquiridos da Gibco[®]. As células foram cultivadas em meio DMEM com alta quantidade de glicose, suplementado com 1,0% de L-glutamina (Gibco[®]), 2,6 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, EUA), 3,7 g de bicarbonato de sódio (Neon Comercial Ltda, São Paulo, SP), 10,0% de SBF (Gibco[®]) e 1,0% de solução de antibiótico/antimicótico (10.000 U de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 μ g de anfotericina em 1 mL, Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.2.3.2.2. Obtenção do lisado celular

Após o cultivo celular (*item 3.2.3.2.1*), as células HDFn foram tripsinizadas em solução de tripsina/EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, EUA) e suspensões celulares contendo 8 x 10^5 e 16 x 10^5 células/eppendorf foram centrifugadas a 180g por 7 minutos a 10°C (protocolo do fornecedor das células HDFn, Gibco[®]). Os sobrenadantes foram descartados e os peletes ressuspensos em 200 µL de tampão de lise: 50 mM Tris (pH-7,5), 1 mM DTT, 0,02% (v/v) NP-40, 50 mg/L inibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich, EUA), 50 mg/L PMSF (Sigma-Aldrich, EUA), 5 mg/L leupeptina (Sigma-Aldrich, EUA), 5 mg/L aprotinina (Sigma-Aldrich, EUA) e contendo ou não 5 mM de ácido ascórbico (SELLAR et al., 2006). Em seguida, os eppendorfs contendo as suspensões celulares foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para posterior procedimento de lise celular (Figura 10).



Figura 10 - Representação esquemática do procedimento de obtenção do lisado de células HDFn. Pellet Pestle Com а figura do Motor Kontes retirada de final http://sigma.octopart.com/29873855/image/Kimble-Chase-749540-0000.jpg> Arte elaborada pela autora.

Para a obtenção dos lisados celulares, as suspensões celulares armazenadas foram descongeladas e mantidas sob banho de gelo. Em seguida, essas suspensões foram submetidas ao processo de lise celular por dois procedimentos: i) ação mecânica usando o Pellet Pestle[®] Motor Kontes (Sigma-Aldrich, EUA) que rompe as estruturas da membrana por vibração contínua do pilão acoplado na extremidade do motor e, ii) três ciclos de congelamento e

descongelamento da suspensão celular empregando nitrogênio líquido e estufa a 30°C (Figura 10).

O número de células suspensas que deveria ter em cada eppendorf para obter quantidade significativa de calcineurina para medida de sua atividade foi definida pelo teor de proteínas presentes no lisado celular.

3.2.3.2.3. Irradiação do lisado celular e definição da dose de UVA-1

Todo o volume de lisado celular presente em cada eppendorf, obtido no item anterior *3.2.3.2.2*, foi transferido para um poço de uma microplaca de 24 poços e correspondeu a uma amostra diferente. Esta microplaca foi coberta por uma placa de quartzo (sem aplicação de protetores solares), mantida sob banho de gelo e com exceção do poço, adicionado de lisado celular, mas não exposto a radiação UVA-1 (controle não irradiado), os outros três poços, também preenchidos com o lisado celular, foram sequencialmente expostos a 12 J/cm², 18 J/cm² e 24 J/cm² de radiação UVA-1, utilizando o sistema de irradiação Bio-Espectra-3 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França) e a lâmpada UVA-1 com pico máximo em 270 nm (Figura 11).



Figura 11 – Espectro de emissão da lâmpada UVA-1.

Em seguida, os lisados celulares irradiados ou não foram transferidos para eppendorfs e centrifugados a 20817*g* por 10 minutos a 4°C para obtenção dos sobrenadantes (Figura 12). Quinze microlitros de cada fração sobrenadante foram empregados no ensaio de determinação da atividade da calcineurina, seguindo o procedimento realizado com a

calcineurina comercial descrito no *item 3.2.3.1.2*, mantendo as mesmas condições reacionais. A dose de radiação UVA-1 selecionada correspondeu àquela capaz de reduzir em 50% a atividade da enzima calcineurina quando comparada com a atividade da enzima presente no lisado não exposto à radiação UVA-1.

A atividade da calcineurina foi calculada após substituir a variável y da equação de regressão linear da curva de calibração de fosfato (obtida no *subitem C do item 3.2.3.1.1*) pela absorvância resultante da subtração entre a quantidade de fosfato inorgânico livre presente nas amostras dos brancos (todos os componentes do meio reacional exceto o substrato) e a quantidade de fosfato encontrada nos lisados celulares irradiado (CI) e não irradiado (CNI).

Uma unidade de atividade de calcineurina foi definida como a quantidade em pmoles de fosfato liberado pela calcineurina em 30 minutos de reação nas condições de ensaio. A atividade da calcineurina foi expressa em porcentagem para a curva dose-resposta, onde a quantidade de fosfato liberado pelas amostras de lisado celular não irradiado foi considerada como a quantidade máxima da atividade da enzima (100%). E para os demais resultados, a atividade da calcineurina foi expressa em pmol/30 min de fosfato liberado.



Figura 12 - Representação esquemática do procedimento de irradiação do lisado celular e da determinação da atividade da enzima calcineurina. Arte elaborada pela autora.

Após a definição da dose de radiação UVA-1 a ser incidida sobre os lisados celulares, repetiu-se o experimento usando, além dos lisados referentes aos controles (CNI e CI), o lisado protegido pelo protetor solar comercial da Marca B com FPS-60/PPD-41 (protetor com maior concentração de filtros orgânicos UVA-1 e UVA-2) e exposto a dose de radiação UVA-1 previamente estabelecida. A finalidade desse teste foi avaliar se a redução induzida por UVA-1 à atividade da enzima calcineurina seria evitada ou amenizada pela proteção fornecida pelo fotoprotetor. Podendo assim, ser um ensaio aplicado na avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares com diferentes fatores de proteção.

3.2.3.2.4. Estabelecimento das condições reacionais ideais para medida da atividade da calcineurina no lisado celular

Para que a atividade da calcineurina fosse um marcador biológico para avaliação do potencial fotoprotetor de protetores solares foi necessário realizar modificações no meio reacional para aumentar a sensibilidade do ensaio e a disponibilidade da enzima a ser quantificada. No entanto, a concentração de substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado (7,5 μ M), a temperatura (30°C) e o tempo de reação (30 minutos) empregados na deterninação da atividade da calcineurina comercial (*item 3.2.3.1.2*) foram mantidos. As modificações avaliadas foram:

- a) Os lisados das células HDFn, expostos ou não a dose de radiação UVA-1 préestabelecida e sob proteção ou não do protetor solar marca B com FPS-60/PPD-41, foram diluídos 1:1 e 1:2 em tampão ensaio 2x sem a presença de calmodulina (1:1, v/v) e realizada a medida da atividade da enzima calcineurina. Para comparação avaliou-se novamente o lisado concentrado na mesma microplaca dos lisados diluídos;
- b) Outro parâmetro avaliado foi a adição de ácidos inibidores das demais fosfatases, pertencentes a mesma família da calcineurina (PP2B), fosfatases serina/treonina (PPs, do inglês *Protein serine/threonine Phosphatase*) presentes em células de mamíferos, conhecidas como PP1, PP2A e PP2C (FRUMAN et al., 1996).

Os inibidores utilizados foram o ácido ocadaico e o ácido abscísico, cujas concentrações necessárias para o processo inibitório das fosfatases interferentes na atividade da calcineurina são > 3 μ M para o ácido ocadaico (KRISTELLER, 2007) e de 125 nM para o ácido abscísico (DELGADO, 2011).

O efeito inibitório desses ácidos, nas referidas concentrações, foi avaliado por dois procedimentos diferentes: i) inibidores adicionados diretamente ao meio reacional contendo o tampão ensaio 2x/calmodulina (previamente definido), o substrato (fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado) e a presença de uma alíquota da fração sobrenadante proveniente do lisado celular não exposto à radiação UVA-1; ii) inibidores adicionados ao lisado celular não irradiado e mantidos sob agitação em TA por 30 minutos, a seguir, uma alíquota dessa mistura foi transferida ao meio reacional constituído de tampão ensaio 2x/calmodulina (previamente definido).

c) O tampão de ensaio 2x/calmodulina, usado no meio reacional, teve a concentração de íons cálcio aumentada de 1 mM para 2,5 mM de CaCl₂.

3.2.3.2.5. Avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares contra a radiação UVA-1 pela medida da atividade da calcineurina nos lisados de células primárias

Após a definição das condições reacionais, a reação enzimática consistiu no uso do lisado celular exposto ou não a dose de radiação UVA-1 previamente determinada e protegido ou não pelos protetores solares comerciais das marcas A e B. Transcorrido o período de irradiação, uma alíquota de 50 μ L de cada lisado foi transferida para uma outra microplaca de 24 poços e diluída (fator de diluição previamente estabelecido) em 100 μ L de tampão ensaio 1x (sem presença de calmodulina). Ao lisado diluído adicionou-se o ácido ocadaico 3 μ M e o ácido abscísico 125 nM. As misturas foram mantidas sob agitação em TA por 30 minutos. Em seguida, foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas a 20817*g* por 20 minutos a 10°C. 100 μ L de cada fração sobrenadante foram transferidos para novos epperdorfs e reservados para uso na reação enzimática (Figura 13).



Figura 13 – Representação esquemática das etapas do processo de determinação da atividade enzimática da calcineurina no sobrenadante do lisado celular. Arte elaborada pela autora.

A primeira etapa da reação enzimática consistiu em adicionar, em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota da solução de ácido ascórbico 3,18 mM ao poço correspondente ao lisado celular não irradiado e não protegido de protetor solar (controle não irradiado, CNI).

A segunda etapa consistiu na adição de 25 μ L de tampão ensaio 2x/calmodulina (previamente definido) e de 20 μ L de cada sobrenadante (proveniente da mistura de lisado e inibidores) aos poços referentes ao CNI, ao lisado irradiado e não protegido de protetor solar (controle irradiado, CI) e aos lisados expostos à radiação UVA-1 e protegidos pelos fotoprotetores (marcas A e B).

A microplaca contendo esses componentes foi agitada a TA por 20 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se os 10 μ L de água MiliQ aos poços referentes ao branco (reação na ausência de substrato) e 10 μ L de substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado (7,5 μ M) aos demais poços. A microplaca foi incubada a 30°C por cerca de 30 minutos, sob agitação. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução do corante verde de malaquita, composta por 93 μ L de água miliQ e 12 μ L de reagente VM (*subitem B do item 3.2.3.1.1*) e após 20 minutos sob agitação, realizou-se a

leitura da densidade óptica em 620 nm utilizando o espectrofotômetro Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) (Figura 13).

3.2.3.2.6. Avaliação da precisão do ensaio *in vitro* de medida da eficácia de protetores solares pela medida da atividade de calcineurina nos lisados de células primárias

O ensaio *in vitro* de determinação da eficácia fotoprotetora de protetores solares por medida da atividade da calcineurina nos lisados das células primárias HDFn foi avaliado quanto a precisão inter-dia, utilizando células com passagens do ciclo de crescimento celulars diferentes (foram testadas células da primeira a quarta passagem) e dias de execução diferentes (n=4).

3.2.3.2.7. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o software OriginPro 7,0 (OriginLab Corporation, EUA). Para o ensaio *in vitro* de determinação da atividade da calcineurina, aplicou-se o teste estatístico ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações de Tukey. Os valores de p<0,05 mostraram evidências estatísticas de que houve uma diferença entre os dados em questão no âmbito do intervalo de confiança de 95%.
	45

4. Resultados

4.1 Confirmação da presença dos filtros orgânicos descritos na composição dos protetores solares comerciais por CLAE

O procedimento de extração dos filtros orgânicos presentes nos protetores solares foi validado pela medida de recuperação por adição de padrão. Os resultados mostraram que a porcentagem de recuperação dos filtros UV na fração diclorometano variou de 93,05% a 101,55% para os filtros solares da marca A e 73,85% a 93,20% para os filtros da marca B. Estes valores foram considerados aceitáveis de acordo com a Sabater-Tobella e Vilumara-Torrallardona (1988).

A análise qualitativa dos protetores solares comerciais por CLAE confirmou a composição de todos os filtros orgânicos mencionados no rótulo das embalagens, como pode ser observado nos cromatogramas representados nas Figuras 14 e 15. Os filtros orgânicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os padrões utilizados. Nenhum pico cromatográfico foi detectado na fase aquosa do processo de extração para os fotoprotetores da marca A (Figura 14B), o que certifica a ausência de filtros orgânicos solúveis em água, conforme a descrição nos rótulos dos produtos. Por outro lado, na fase aquosa obtida na extração dos produtos da marca B, o filtro TDSA foi detectado, confirmando a presença do único filtro UV solúvel em água indicado na embalagem destes protetores solares (Figura 15B).



Figura 14 – Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 30 e 60, obtidos da análise qualitativa por CLAE. (A) Fase diclorometano resultante do processo de extração. (B) Fase água/metanol obtida no processo de extração.

OTC = Octocrylene; AVO = Avobenzone; EHT = Ethylhexyl triazone; BEMT = Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazone.



Figura 15 - Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca B com fatores de proteção solar (FPS) de 30, 40 e 60 e de Persistent Pigment Darkening (PPD) de 15, 25 e 41, obtidos da análise qualitativa por CLAE. (A) Fase diclorometano resultante do processo de extração. (B) Fase metanol/água obtida no processo de extração.

OCT = Octocrylene; AVO = Avobenzone; EHS = Ethylhexyl salicylate; HMS = Homosalate; EHT: Ethylhexyl triazone; DTS = Drometrizole trisiloxane; BEMT = Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazone; TDSA: Terephthalydene dicamphor sulfonic acid.

4.2. Desenvolvimento de ensaios *in vitro* para avaliação do potencial fotoprotetor de protetores solares

4.2.1. Avaliação de desempenho do sistema de irradiação

Os resultados da avaliação de desempenho do sistema Bio-Spectra-3 mostraram que as microplacas de células devem ser posicionadas na região central do equipamento, ocupando uma distância máxima de 40 cm a partir do radiômetro fixado ao centro da bandeja tanto para o lado esquerdo quanto para a direita. Posições anteriores e posteriores à região central devem ser evitadas, pois a incidência de radiação diminui em 50% nessas posições. A distância entre a fonte de luz (radiação UVA e UVB) e as células deve ser de 20 cm, e as

microplacas devem ser protegidas da luz ambiente, pois os resultados mostraram que a luz externa interfere nas respostas celulares dos parâmetros formação de EROs intracelular e medida da viabilidade celular.

4.2.2. Desenvolvimento de ensaios *in vitro* para medida da eficácia fotoprotetora de protetores solares contra as radiações UVA e UVB usando culturas de células

4.2.2.1. Linhagens celulares e parâmetros biológicos

4.2.2.1.1. Viabilidade celular

As linhagens celulares L929 e HaCaT foram expostas a diferentes doses de radiação UVA e nenhuma dose foi capaz de reduzir a viabilidade celular de ambas as linhagens, como pode ser verificado nas Figuras 16 A e B que representam as doses máxima utilizadas: 25 J/cm² e 30 J/cm² para as células de L929 e HaCaT, respectivamente.



Figura 16 – Determinação da viabilidade celular medida pelo ensaio do corante resazurina após exposição à radiação UVA. (A) Células de fibroblastos da linhagem L929 expostas a dose máxima de 25 J/cm². (B) Células de queratinócitos da linhagem HaCaT submetidas a dose máxima de 30 J/cm². CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVA e não protegidas com os protetores solares comerciais).

Para avaliação dos efeitos da radiação UVB, os dois tipos de linhagens de células (L929 e HaCaT) também foram expostos a doses de radiação que variaram de 0,05 J/cm² a 20,00 J/cm². Entre as linhagens celulares testadas, as células de fibroblastos L929 foram selecionadas por apresentarem melhor relação linear entre a viabilidade celular e a dose de



radiação (Figura 17), pelo fácil cultivo e por fornecer maior número de células à curto prazo (alto rendimento).

Figura 17 – Curvas dose-resposta obtidas para o parâmetro biológico viabilidade celular após exposição a diferentes doses de radiação UVB. (A) Células de fibroblastos da linhagem L929 expostas a doses de radiação UVB que variaram de 0,05 a 20,00 J/cm². (B) Células de queratinócitos da linhagem HaCaT submetidas a doses de radiação UVB que variaram de 0,30 a 10,00 J/cm². CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas à radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

A dose de radiação UVB selecionada para avaliar a eficácia fotoprotetora dos produtos comerciais foi 0,50 J/cm² que proporcionou uma redução de 58,60 \pm 1,67% na viabilidade celular. De acordo com Figueiredo et al. (2014), a dose de radiação UVB que proporcionou uma redução de aproximadamente 50% no número de células viáveis possibilitou avaliar o potencial fotoprotetor de extratos naturais.

Os protetores solares comerciais com diferentes FPSs e FPSs/PPDs protegeram as células L929 contra a perda de viabilidade induzida pela radiação UVB. Os produtos da marca A com FPSs de 30 e 60 promoveram um aumento na viabilidade celular, sob incidência de radiação UVB, de $10,80 \pm 3,30\%$ e $29,00 \pm 8,61\%$, respectivamente, em comparação ao controle irradiado (CI). Enquanto que, as células L929 protegidas com o fotoprotetor de FPS-15 apresentaram a mesma viabilidade que as células irradiadas e não protegidas (CI) (Figura 18).



Figura 18 - Determinação da viabilidade celular medida pelo ensaio do corante resazurina após exposição a 0,5 J/cm² de radiação UVB. As células de fibroblastos da linhagem L929 foram protegidas com protetores solares da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 30 e 60 e com protetores solares da marca B com FPSs de 30, 40 e 60 e com Persistent Pigment Darkening (PPD) de 15, 25 e 41. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

Os protetores solares da marca B ofereceram maior proteção que os produtos da marca A contra a perda de viabilidade celular induzida pela radiação UVB. O protetor solar com FPS/PPD 30/15 melhorou a viabilidade celular em $28,91 \pm 5,61\%$ em relação ao controle irradiado (CI) e, os produtos com FPSs/PPDs de 40/25 e 60/41 resultaram em um percentual de viabilidade celular semelhante ao do controle não irradiado (CNI), indicando 100% de proteção contra a perda de viabilidade celular (Figura 18).

4.2.2.1.2. Peroxidação Lipídica

As medições do complexo MDA-TBA (formado pela decomposição química dos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica) foram utilizados para quantificar a peroxidação lipídica nas linhagens de células L929 e HaCaT expostas a diferentes doses de

radiação UVA e UVB. Os resultados mostraram que nas doses testadas de radiação UVA, nenhuma indução de produção de MDA foi observada nas células (dados não mostrados).

Por outro lado, doses de radiação UVB que variaram de 1 a 40 J/cm² foram capazes de induzir a peroxidação lipídica em todas as linhagens celulares testadas, com a maior quantidade de MDA detectada em células de L929. Aumento na quantidade de MDA foi observado até a dose de 30 J/cm² de UVB, enquanto que em doses maiores houve diminuição na quantidade do aldeído formado (Figura 19).



Figura 19 - Curva dose-resposta obtida para o parâmetro biológico peroxidação lipídica após exposição a diferentes doses de radiação UVB. Células de fibroblastos da linhagem L929 expostas a doses de radiação UVB que variaram de 10 a 40 J/cm². CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

Portanto, os fibroblastos da linhagem L929, expostos a uma dose de 30 J/cm² de UVB, foram usados para avaliar a eficácia fotoprotetora dos protetores solares comerciais contra a indução da peroxidação lipídica. Todas as formulações de protetores solares da marca A e as formulações da marca B com FPSs/PPDs de 40/25 e 60/41 foram capazes de proteger as células contra a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVB (Figura 20). Somente o protetor solar com FPS/PPD-30/15 da marca B (com composição e veículo diferentes entre as formulações da marca B) não mostrou eficácia protetora significativa contra a peroxidação lipídica, ou seja, a quantidade de MDA obtida foi similar a quantidade de MDA formado pelo controle irradiado – CI (Figura 20).



Figura 20 - Determinação da peroxidação lipídica medida com base na formação do complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico (MDA/TBA) após exposição a 30 J/cm² de radiação UVB. As células de fibroblastos da linhagem L929 foram protegidas com protetores solares da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 30 e 60 e com protetores solares da marca B com FPS de 30, 40 e 60 e com Persistent Pigment Darkening (PPD) de 15, 25 e 41. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVB e não protegidas com os protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

4.2.2.1.3. EROs intracelulares

As duas linhagens de células (L929 e HaCaT) foram expostas à quantidades variáveis de radiação UVB (0,10 a 20,00 J/cm²) e tratadas com uma solução de DCFH₂-DA (sonda fluorescente) (Figura 21). Entre estas culturas, somente as células HaCaT formaram EROs intracelulares de uma forma dependente da dose (Figura 20) e, por esta razão, foram as células selecionadas para avaliação dos protetores solares comerciais. A dose de radiação UVB definida foi de 2,5 J/cm².



Figura 21 - Curvas dose-resposta obtidas para o parâmetro biológico formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após exposição a diferentes doses de radiação UVB. (A) Células de fibroblastos da linhagem L929 expostas a doses de radiação UVB que variaram de 5,0 a 40,0 J/cm². (B) Células de queratinócitos da linhagem HaCaT submetidas a doses de radiação UVB que variaram de 0,1 a 20,0 J/cm². CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

Para os produtos da marca A, os protetores solares com FPSs 15, 30 e 60 não impediram a produção de EROs pelas células HaCaT expostas a 2,5 J/cm² de radiação UVB (Figura 22). Entre os produtos de marca B, o protetor solar com FPS/PPD de 30/15 não foi capaz de proteger as células contra a formação de EROs induzida por UVB. No entanto, os protetores solares com fatores de proteção de 40/25 e 60/41 resultaram em 59,85 \pm 3,57% e 65,07 \pm 1,76% de proteção das células contra a formação de EROs, respectivamente. Assim, a geração de EROs induzidas pela radiação UVB não foi um parâmetro adequado para avaliar a eficiência dos fotoprotetores ou discriminar a proteção fornecida pelos protetores solares com diferentes FPSs/PPDs.



Figura 22 - Quantificação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas em queratinócitos HaCaT, medidas com o uso da sonda fluorescente DCFH₂-DA após exposição a 2,5 J/cm² de radiação UVB. As células de quertinócitos da linhagem HaCaT foram protegidas com protetores solares da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 30 e 60 e com protetores solares da marca B com FPS de 30, 40 e 60 e com Persistent Pigment Darkening (PPD) de 15, 25 e 41. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVB e não protegidas com os protegidas com os protetores solares de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

As duas linhagens de células (L929 e HaCaT) também foram testadas sob a radiação UVA, e a cultura de células que produziu as maiores quantidades de EROs de maneira dosedependente foi a cultura de HaCaT (Figura 23). A proteção das células com formulações fotoprotetoras sob radiação UVA (20 J/cm²), resultou em menor quantidade de fluorescência em comparação com o controle irradiado (CI).



Figura 23 - Curvas dose-resposta obtidas para o parâmetro biológico formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) após exposição a diferentes doses de radiação UVA. (A) Células de fibroblastos da linhagem L929 expostas a doses de radiação UVA que variaram de 0,25 a 25,00 J/cm². (B) Células de queratinócitos da linhagem HaCaT submetidas a doses de radiação UVA que variaram de 1,00 a 40,00 J/cm². CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

Este ensaio *in vitro* mostrou que os protetores solares comerciais de ambas as marcas foram efetivos na proteção das células HaCaT contra a indução de espécies reativas pela radiação UVA, o que confirma o potencial de absorção destas formulações fotoprotetoras (Figura 24).



Figura 24 - Quantificação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de queratinócitos HaCaT, medidas com o uso da sonda fluorescente DCFH₂-DA após exposição a 20 J/cm² de radiação UVA. As células de quertinócitos da linhagem HaCaT foram protegidas com protetores solares da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 30 e 60 e com protetores solares da marca B com FPS de 30, 40 e 60 e com Persistent Pigment Darkening (PPD) de 15, 25 e 41. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVB e não protegidas com os protetores solares comerciais). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

4.2.2.2. Validação dos ensaios in vitro de avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares

A) Seletividade

A viabilidade celular foi um dos parâmetros biológicos mais eficiente na avaliação da eficácia fotoprotetora de formulações comerciais expostas à radiação UVB. Desta forma, a seletividade do parâmetro viabilidade celular para avaliar a eficiência dos protetores solares em absorver a radiação UVB foi determinada por meio do uso do extrato vegetal, *Garcinia brasiliensis* que absorve na região do UVB e a matéria prima Astaxantina que absorve na região do UVA.

O extrato de *Garcinia brasiliensis*, nas três concentrações testadas (2%, 5% e 10%), foi capaz de evitar a redução da viabilidade das células de fibroblastos L929 expostas à 0,5 J/cm² de radiação UVB, de modo concentração dependente quando comparado ao controle exposto à radiação e sem a presença do extrato (CI) (Figura 25). Enquanto que, a astaxantina que não absorve na região do UVB, não foi capaz impedir a perda da viabilidade celular das células L929 exposta à radiação UVB. Isso foi comprovado ao analisar as duas concentrações testadas, onde a viabilidade dos fibroblastos foi equivalente ao controle irradiado (Figura 25).



Figura 25 - Determinação da viabilidade celular medida pelo ensaio do corante resazurina após exposição a 0,5 J/cm² de radiação UVB. As células de fibroblastos da linhagem L929 foram protegidas com o extrato de *Garcinia brasiliensis* nas concentrações de 2%, 5% e 10% e com a astaxantina nas concentrações de 2% e 5%. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVB e não protegidas com os extratos de *Garcinia brasiliensis* e com a astaxantina). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVB e não protegidas com os extratos de *Garcinia brasiliensis* e com a astaxantina). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

Sob radiação UVA, o parâmetro biológico que obteve melhor desempenho na avaliação do potencial fotoprotetor de formulações comerciais foi a formação de EROs. Sua seletividade foi comprovada pelo teste com a astaxantina que demonstrou um considerável poder de absorção da radiação UVA e, consequentemente, uma redução na geração das espécies reativas pelos queratinócitos HaCaT, quando comparada com o controle irradiado (Figura 26), após exposição a 20 J/cm² de radiação UVA. Os resultados não foram mais expressivos, como o resultado observado pelo controle positivo (protetor solar FPS-15), provavelmente pela baixa concentração de ativo (3%) presente na matéria-prima utilizada. O extrato da *Garcinia brasiliensis* não apresentou capacidade de absorção da radiação UVA, condizente com seu espectro de absorção UV. Sendo que, as concentrações testadas

resultaram na formação de EROs semelhante a quantidade formada pelo controle irradiado (Figura 26).



Figura 26 - Quantificação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de queratinócitos HaCaT, medidas com o uso da sonda fluorescente DCFH₂-DA após exposição a 20 J/cm² de radiação UVA. As células de queratinócitos da linhagem HaCaT foram protegidas com o extrato de *Garcinia brasiliensis* nas concentrações de 2%, 5% e 10% e com a astaxantina nas concentrações de 2% e 5%. CNI corresponde ao controle não irradiado (células não expostas a radiação UVA e não protegidas com os extratos de *Garcinia brasiliensis* e com a astaxantina). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVA e não protegidas com os extratos de *Garcinia brasiliensis* e com a astaxantina). CI = Controle irradiado (células expostas a radiação UVA e não protegidas com os extratos de *Garcinia brasiliensis* e com a astaxantina). ns = Não houve diferença estatística significativa de acordo com o teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p < 0,05).

B) Precisão inter-dia dos ensaios in vitro

A precisão intermediária (medições inter-dia) foi estabelecida com base na repetibilidade das determinações dos FPSs e PPDs calculados para as amostras de protetores solares das marcas A e B ao longo de três dias. O coeficiente de variação inter-ensaio para os valores calculados de FPSs dos protetores solares da marca A, empregando a viabilidade celular como um parâmetro biológico, variou entre 3,00% a 6,10%. Quando a peroxidação lipídica foi utilizada como um parâmetro biológico, o coeficiente de variação para os valores de FPSs calculados variaram de 4,30% a 8,40% e de 1,70% para 4,10% para protetores solares das marcas de A e B, respectivamente. Para o ensaio de formação de EROs, a precisão intermediária para os FPSs calculados ficou entre 5,59% e 8,06%, enquanto que a variação

para os PPD calculados foi de 0,90% a 5,50%, ambos resultados referem aos produtos da marca B.

C) Exatidão dos ensaios in vitro

Para os ensaios *in vitro*, utilizando os parâmetros biológicos viabilidade celular, peroxidação lipídica e formação de EROs, a exatidão para os valores de FPSs calculados variaram de 93,30% a 110,00% e para os valores de PPDs de variaram de 97,56% a 98,80%.

Os valores de FPSs foram calculados para os protetores solares de ambas as marcas em termos de viabilidade celular, peroxidação lipídica e formação de EROs. Para a marca A, os FPSs calculados em termo de viabilidade celular foram 14,98, 30,13 e 59,93 (correspondendo aos FPSs 15, 30 e 60 mencionados nas embalagens, respectivamente). Quando a peroxidação lipídica foi utilizada como parâmetro biológico, os FPSs calculados foram 14,98, 30,56 e 59,55 para a marca A (correspondente aos FPSs 15, 30 e 60 rotulados, respectivamente) e, 28,55, 43,56 e 57,93 para os produtos da marca B (FPSs rotulados como 30, 40 e 60, respectivamente). Para a geração de EROs, os valores de FPSs calculados foram 27,92, 43,42 e 57,00 (FPSs etiquetados como 30, 40 e 60, respectivamente) e os valores de PPDs calculados foram 14,64, 24,70 e 39,99 em relação aos PPDs rotulados como 15, 25 e 41, respectivamente.

4.2.3. Desenvolvimento de ensaio *in vitro* para avaliação da eficácia fotoprotetora na faixa de absorção UVA-1

4.2.3.1. Desenvolvimento de ensaio para medida da atividade da calcineurina

4.2.3.1.1. Quantificação de fosfato inorgânico usando o reagente verde de malaquita

Para medir a atividade enzimática da calcineurina utilizou o método espectrofotométrico de Baykov, Evtushenko e Avaeva (1988), adaptado para quantificação do fosfato inorgânico em picomol usando microplacas de 96 poços e a proporção de 93 μ L de água, 50 μ L de amostra e 12 μ L de verde de malaquita.

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque de KH₂PO₄, da qual foram obtidas oito níveis de concentração de fosfato que variaram de 100 a 5000 pmol. Após a análise de regressão linear dos dados de absorvância em 620 nm versus concentração de fosfato em pmol, a linearidade do ensaio mostrou estar entre a faixa de concentrações de

250 a 2000 pmol de fosfato, conforme visualizado na Figura 27B e Tabela 5. Acima dessa concentração, observou-se que a curva atingiu um platô, ou seja, a quantidade de fosfato detectada não foi proporcional ao aumento da concentração das soluções de KH_2PO_4 (Figura 27A). O desvio padrão de cada ponto da curva variou de 0,005 a 0,011. A precisão do método variou de 6,40% a 13,90% e a exatidão de 98,74% a 101,74%.



Figura 27 - Curva de calibração de fosfato obtida pela reação entre soluções de KH_2PO_4 em diferentes concentrações (pmol) e o reagente verde de malaquita, sendo que o complexo verde formado foi lido em 620 nm. (A) Curva de calibração obtida até 5000 pmol. (B) Porção linear da curva de calibração (250 a 2000 pmol).

Resumo dos c	oeficientes				
	Valor	Desvio padrão	Valor-t	Prob> t	
Inclinação	2,0207E-4	1,4261E-6	141,6854	0	
Intercepto	0,0083	0,0015	5,3773	1,9041E-7	
Resumo teste	ANOVA				
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor-F	Prob> F
Modelo	3,3532	1	3,3532	20074,7603	0
Erro de predição	0,0372	223	1,6703E-4		
Total	3,3904	224			
Resumo do m	odelo				
	R	Soma residual dos quadrados	Adj. <i>R-</i> quadrado	Root-MSE	Ν

Tabela 5 – Dados da análise de regressão linear da curva de calibração de fosfato obtida para a faixa de concentração de 250 a 2000 pmol, pelo software estatístico OriginPro 7,0.

				<i>K</i>	esultados
			•		
Modelo	0,9945	0,0372	0,9889	0,0129	225

4.2.3.1.2. Determinação das condições ideais de medida da atividade da calcineurina

Para conhecer qual a quantidade máxima de fosfato que pode ser liberada de 7,5 μ M do substrato fosfopeptídeo RII Ser-fosforilado pela quantidade de atividade da calcineurina no tempo de reação de 30 minutos, nas condições de ensaio estabelecidas pelo fornecedor Enzo® do Kit comercial (Calcineurin Cellular Activity Assay Kit) e no trabalho proposto por Sellar et al. (2006), uma curva foi construída relacionando unidades de atividade da calcineurina comercial versus quantidade em pmol de fosfato liberada de 7,5 µM de substrato em 30 minutos de reação, onde o reagente verde de malaquita foi empregado para a quantificação do fosfato (Figura 28 A e B). Os dados mostram que existe uma relação linear entre 5,27 U a 59,1 U de atividade de calcineurina e as quantidades de 200 a 1773 pmol de fosfato liberado para concentração de substrato usado. Para unidades de atividade da enzima acima de 59,1 U, não foi observado aumento da quantidade de fosfato. Isto sugere que para unidades de atividade superior a 59,1 U a quantidade de substrato utilizada passa ser limitante. Assim, para 7,5 µM de substrato a quantidade ideal de unidades de calcineurina seria de 32 U para o tempo de reação de 30 minutos, pois a quantidade liberada de fosfato seria de aproximadamente 1000 pmol que estaria no meio da curva de calibração do fosfato (Figura 27 B)



Figura 28 - Relação entre a quantidade de fosfato liberado (pmol/30 min) da reação enzimática entre a calcineurina comercial e o substrato sintético (fosfopepdídeo RII *Ser*-fosforilado), dosado pelo método espectrofotométrico com o reagente verde de malaquita, versus unidades de atividade de calcineurina comercial (U). (A) Curva analítica de 1 U a 80 U de calcineurina comercial. (B) Faixa linear (5,27 U a 59,10U) da curva analítica (A).

*Equação da reta usada no cálculo para obtenção da quantidade de fosfato liberado (pmol/30 min): y = 0,0002x + 0,0069.

4.2.3.1.3. Determinação das condições de medida da atividade da calcineurina em lisados de células primárias

4.2.3.1.3.1 Células primárias

Após estabelecer, usando a calcineurina comercial, a faixa de atividade da calcineurina que pode ser determinada dentro da faixa de linearidade do método de quantificação do fosfato inorgânico pelo método de verde de malaquita, e depois de verificar a quantidade máxima de atividade de calcineurina que pode ser determinada nas condições de ensaio enzimático (7,5 μ M de substrato, 30 minutos de reação a 30°C) foi necessário estabecer as condições ideais para determinação da quantidade de atividade da calcineurina no lisado celular dos fibroblastos primários HDFn.

4.2.3.1.3.2. Obtenção do lisado celular

Para a obtenção do lisado celular foi necessário definir a quantidade de células HDFn a serem lisadas (8 x 10^5 ou $16 x 10^5$) e associar com o procedimento de lise. Fruman et al. (1996) estabeleceram que a quantidade de proteínas no lisado celular considerada ideal para a quantificação da atividade da calcineurina era de 100-500 µg/mL. A Tabela 6 mostra que o número de 16 x 10^5 células de HDFn associado ao procedimento de lise mecânica (aparelho Pellet Pestle[®] Motor Kontes, Sigma-Aldrich, EUA) possibilitaram um teor de proteínas de 417,55 ± 8,79 µg/mL, condizente com a quantidade de proteínas definida por Fruman et al. (1996). Sendo assim, ficou estabelecido a quantidade de células HDFn ideal para o ensaio de medida da atividade da calcineurina deste estudo.

Tabela 6 - Influência do procedimento de lise celular associado ao número de células de fibroblastos primários neonatais (HDFn) na quantidade de proteínas presente no lisado celular.

Número de células	Procedimento de lise celular	Teor de proteínas (µg/mL)
8 x 10 ⁵	Três ciclos de congelamento/descongelamento	107,58 ± 3,41
16 x 10 ⁵	Três ciclos de congelamento/descongelamento	$206,73 \pm 2,72$

16 x 10 ⁵	Ação mecânica (Pellet Pestle [®] Motor Kontes)	$417,55 \pm 8,79$
----------------------	---	-------------------

Outro procedimento que contribuiu para a manutenção da atividade da enzima calcineurina, presente no lisado celular, foi o uso de um tampão de lise contendo 5 mM de ácido ascórbico, capaz de conservar a atividade enzimática durante o congelamento até a realização do ensaio, como relatada na literatura (SELLAR et al., 2006; SMIT et al., 2008; SMIT et al., 2010). Enquanto que, os homogeneizados armazenados em tampão sem ácido ascórbico reduziram significativamente a atividade da enzima calcineurina.

4.2.3.1.3.3. Irradiação do lisado celular e definição da dose de UVA-1

Após a definição das condições de uso do lisado, buscou estabelecer a dose de radiação UVA-1 capaz de reduzir a atividade da calcineurina significativamente. Os lisados expostos a 12 J/cm², 18 J/cm² e 24 J/cm² de radiação UVA-1 apresentaram 75,55%, 57,33% e 43,08% de atividade de calcineurina, respectivamente (Figura 29A). Em outro experimento, avaliou-se a quantidade de EROs gerada na fração sobrenadante do lisado celular exposto a diferentes doses de radiação UVA-1, pois a quantidade de espécies reativas formadas pode estar relacionada à perda de atividade da calcineurina (SMIT et al., 2010; MUSSON et al., 2011). A atividade da calcineurina reduziu de forma dose dependente em função do aumento da quantidade da enzima teve um decréscimo em aproximadamente 50%, enquanto que a formação de EROs aumentou expressivamente (Figura 29). Diante disso, a dose de UVA-1 selecionada para avaliação da eficácia dos protetores solares comerciais por meio da medida da atividade da calcineurina foi 24 J/cm².

Resultados



Figura 29 - Atividade da calcineurina expressa em percentual (A) e a quantidade de EROs (B) gerada na fração sobrenadante do lisado de células de fibroblastos primários neonatais (HDFn) expostos a diferentes quantidades de radiação UVA-1.

4.2.3.1.3.4. Estabelecimento das condições reacionais ideais para medida da atividade da calcineurina no lisado celular

Com o estabelecimento da dose de radiação UVA-1 a ser utilizada, o experimento realizado com os lisados celulares concentrados, expostos ou não a radiação UVA-1 e protegidos ou não com protetor solar (Marca B, FPS-60/PPD-41), mostrou que a aplicação de protetor solar rico em filtros orgânicos UVA foi capaz de evitar a redução da atividade de calcineurina em torno de 20% (Figura 30).



Figura 30 – Quantificação de fosfato* (pmol/30 min) após reação enzimática entre o substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado (7,5 μ M) e a enzima calcineurina presente na fração sobrenadante dos lisados de células HDFn, expostos ou não a radiação UVA-1 e protegido ou não pelo protetor da marca B com FPS-60/PPD-41. CNI corresponde a fração

sobrenadante do lisado de células HDFn não exposto à radiação UVA-1 e na ausência do protetor solar da marca B com FPS-60/PPD-41. CI corresponde ao sobrenadante do lisado de células HDFn exposto à radiação UVA-1 e na ausência do protetor solar da marca B com FPS-60/PPD-41. Marca B (FPS-60/PPD-41) corresponde ao sobrenadante do lisado de células HDFn exposto à radiação UVA-1 e protegido pelo protetor solar comercial da marca B com FPS-60/PPD-41. Sendo: i) Conc - sobrenadante concentrado; ii) 1:1 - sobrenadante diluído na proporção de 1:1 e iii) 1:2 – sobrenadante mais diluído (1:2).

*Equação da reta usada no cálculo para obtenção da quantidade de fosfato liberado (pmol/30 min): y = 0,0002x + 0,0069.

Quando a quantidade de fosfato foi determinada na fração sobrenadante dos lisados celulares na ausência do substrato (branco) foi observado que o lisado celular possui alta quantidade do íon. Esta alta quantidade de fosfato presente na célula poderia interferir na medida da atividade da calcineurina. O fosfato liberado da reação enzimática entre calcineurina e substrato foi quantificado juntamente com o fosfato da célula e resultou em uma quantidade de íon (pmol) que estava fora da faixa linear da curva de calibração do fosfato.

Ao diluir as frações sobrenadantes dos lisados expostos ou não à radiação UVA-1 e protegidos ou não pelo protetor solar comercial da marca B (FPS-60/PPD-41), em 1:1 e 1:2 no tampão ensaio 2x da reação, observou-se um aumento na atividade da calcineurina. A atividade da calcineurina na fração sobrenadante diluída 1:2 foi aproximadamente 133% maior que atividade enzimática encontrada na fração sobrenadante não diluída (Conc), enquanto que a fração sobrenadante diluida 1:1 apresentou um aumento aproximado de 83% em relação à atividade da enzima presente na fração sobrenadante não diluída (Conc) (Figura 29). O aumento observado de atividade está relacionado a diminuição da interferência do fosfato celular na quantificação do fosfato liberado pela reação enzimática.

Outro parâmetro que contribuiu para redução dos interferentes na medida da atividade da calcineurina, na fração sobrenadante do lisado celular, foi o uso dos ácidos ocadaico e abscísico, inibidores das fosfatases presentes nas células e que pertencem à mesma família da fosfatase calcineurina. Os ácidos foram adicionados ao lisado celular sob agitação que facilitou a homogeneização destes em todo lisado. A medida da atividade na presença dos ácidos permitiu maior seletividade do ensaio para quantificação da atividade da calcineurina na presença de outras fosfatases.

O aumento de 2,5 vezes na concentração de CaCl₂, em presença de calmodulina (componente chave para ativação da calcineurina), proporcionou uma maior atividade da

enzima calcineurina, conforme observado também por Fruman et al. (1996) que utilizaram um tampão ensaio BC contendo a mesma concentração de CaCl₂.

Essas modificações nas condições reacionais (diluição da fração sobrenadante, adição dos ácidos inibitórios e aumento na quantidade de cálcio) contribuíram para medida de maiores atividades da calcineurina, como demonstrado pelos os resultados da Figura 30.

4.2.3.1.3.5. Avaliação da eficácia fotoprotetora dos protetores solares contra a radiação UVA-1 pela medida da atividade da calcineurina nos lisados de células primárias

Após o estabelecimento de todas as condições ideais de medida da atividade da calcineurina no lisado de células HDFn, a atividade da calcineurina foi medida em lisado não exposto à radiação UVA-1 e na ausência dos fotoprotetores comerciais (CNI), em lisados submetidos a fonte de luz UVA-1 e também sem a presença dos protetores solares (CI) e em lisados expostos à radiação UVA-1 e protegidos pelos protetores da marca A com FPSs 15, 30 e 60 e, pelos protetores da marca B com FPSs/PPDs 30/15, 40/25 e 60/41.

Os resultados mostraram que o lisado não exposto à radiação UVA-1 apresentou a maior atividade de calcineurina, 840 pmoles de fosfato liberado em 30 minutos de reação que representou 100% da atividade da enzima nas condições de ensaio. Enquanto que, o controle irradiado (lisado submetido a 24 J/cm² de UVA-1, sem presença de protetores solares) demonstrou uma redução de atividade enzimática de aproximadamente $62,54 \pm 7,65\%$, condizente com os resultados anteriores. Ao avaliar os resultados obtidos para os protetores solares comerciais foi possível verificar que os produtos da marca B, com quantidades maiores de filtros orgânicos que absorvem na região de UVA-1 e UVA-2, foram capazes de proteger a atividade da calcineurina em 34,53% e 38,19%, referentes aos FPSs/PPDs 40/25 e 60/41, respectivamente, em comparação com o controle exposto à radiação UVA-1 sem proteção (CI). O protetor solar da marca B com FPS/PPD 30/15 não mostrou eficiência fotoprotetora contra a radição UVA-1, a atividade da calcineurina foi igual ao do controle irradiado (CI). Assim como, os protetores da marca A, que não apresentam os mesmos filtros orgânicos UVA-1 e UVA-2 presentes na composição dos produtos da marca B, também não foram capazes de proteger a atividade da enzima calcineurina (Figura 31).



Figura 31 - Dosagem da atividade da calcineurina medida em lisados de células primárias HDFn, expostos à 24 J/cm² de radiação UVA-1 e protegidos com os protetores solares comerciais da marca A com FPS-15, FPS-30 e FPS-60 e da marca B com FPS-30/PPD-15, FPS-40/PPD-25 e FPS-60/ PPD-41. CNI = corresponde a fração sobrenadante do lisado de células HDFn não exposto à radiação UVA-1 e na ausência de protetores solares, e CI = corresponde a fração sobrenadante do lisado de células HDFn exposto à radiação UVA-1 e na ausência de protetores solares. Os experimentos foram realizados em triplicata e em 4 dias diferentes. ns = significa que não houve diferença estatística medida pelo teste de ANOVA de uma via, seguido pelo teste de comparações de Tukey (p <0,05).

*Equação da reta usada no cálculo para obtenção da quantidade de fosfato liberado (pmol/30 min): y = 0,0002x + 0,0069.

4.2.3.1.3.6 Avaliação da precisão do ensaio *in vitro* de medida da eficácia de protetores solares pela medida da atividade de calcineurina nos lisados de células primárias

O processo de determinação da atividade da calcineurina foi avaliado com relação a repetição do ensaio em quatro dias diferentes e usando sobrenadantes provenientes de lisados de células com ciclo de crescimento diferentes (de 1^a a 4^a passagem), expostos ou não a radiação UVA-1. Os resultados mostraram-se reprodutivos com uma precisão inter-dias que variou de 2,14% a 10,40%.

	69
 Resultados	

70
 Discussão

5. Discussão

Os protetores solares representam uma importante estratégia para a proteção da pele contra os efeitos danosos da radiação solar (OLIVERIA et al., 2015; SOHN et al., 2016), mas alguns desafios ainda precisam ser superados, tais como determinar a real eficácia e segurança destes produtos. A eficácia é um parâmetro avaliado por ensaios *in vivo* usando seres humanos que medem a formação de eritema/queimadura solar induzida pela fração UVA-2 e UVB do espectro ultravioleta e mudanças pigmentárias imediatas ou persistentes provenientes da exposição à radiação UVA-1 (MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; PELIZZO et al., 2012; GAUSE, CHAUHAN, 2015).

Estas avaliações *in vivo* apresentam desvantagens inerentes em termos de custo, tempo e questões éticas. Primeiro, o recrutamento e tratamento de voluntários estão ligados a despesas elevadas; segundo, os ensaios podem consumir um tempo alto e, por último, estes métodos levantam questões éticas relativas a potenciais danos a voluntários expostos à radiação UVA e UVB por vários períodos de tempo (PELIZZO et al., 2012; SOHN et al., 2016; HUPEL, POUPART, GALL, 2011).

Notavelmente, estes métodos *in vivo* refletem parcialmente os efeitos danosos à pele, induzidos pela radiação UV. Assim, o desenvolvimento de ensaios *in vitro* usando cultura de células que demonstrassem alterações celular e molecular, induzidas pelas radiações UVA e UVB, de tal modo que estas alterações pudessem ser empregadas para avaliação do potencial fotoprotetor de protetores solares, seria um passo importante neste campo. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de ensaios *in vitro* que fossem capazes de avaliar a eficácia de protetores solares contra as radiações UVA e UVB, usando cultura de células da pele.

Para o desenvolvimento dos ensaios *in vitro* foi necessário o emprego do aparelho de irradiação Bio-Espectra-3 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, França). É considerado pelo fabricante um sistema de irradiação de grau científico, com ciclos de irradiação reprodutíveis e equipado com duas fontes de luz UV diferentes: UVA com comprimento de emissão de 320 a 400 nm e pico máximo em 350 nm e, UVB com comprimento de emissão de 280 a 320 nm e pico máximo em 309 nm. Este equipamento é indicado para testes de fotosensibilização e fotoproteção, avaliação de cremes cosméticos, ensaios em culturas, dentre outros (VILBER LOURMAT, 2014).

A radiação UVB, que apresenta menor comprimento de onda e maior energia que a radiação UVA, pode gerar EROs (KARTHIKEYAN et al., 2016). Porém, sua principal ação é a indução direta de danos ao DNA e proteínas. Os raios UVB são absorvidos pelo DNA e

induzem a formação de fotoprodutos diméricos próximos as bases pirimidínicas: dímero pirimidina ciclobutano (CPD) e 6,4-pirimidona-pirimidina (6,4-PP) (ARORA et al., 2015). Além disso, pode induzir quebras nas fitas de DNA, formação de ligações cruzadas entre as fitas de DNA e ligações cruzadas entre DNA-proteína (BERRA, MENCK, MASCIO, 2006; BRENNER, HEARING, 2008).

Em adição, proteínas como o DNA absorvem mais fortemente a radiação UVB, com máximo de absorção ao redor de 280 nm, principalmente pelos aminoácidos aromáticos (BRENNER, HEARING, 2008; BALOGH et al., 2011). No caso da exposição de uma monocamada de células à radiação UVB, as moléculas de DNA destas células estão mais expostas à ação direta desta radiação, diferentemente do que acontece na pele. O DNA de células das camadas epidérmicas e dérmicas está mais protegido da ação dos raios UVB pelo fato dessa radiação ser absorvida em parte pelos aminoácidos aromáticos das proteínas da camada córnea anuclear da pele (MILESI, GUTERRES, 2002; BALOGH et al., 2011; FRUET, 2015).

Por outro lado, a radiação UVA, menos energética que a UVB, induz efeitos danosos às células por mecanismos indiretos pela formação de EROs, que interagem com moléculas de DNA, RNA, proteínas, lipídeos e carboidratos celulares (SAMBANDAM, RATNER, 2011; VENDITTI et al., 2011). No entanto, os efeitos danosos a curto prazo às células são menores que aqueles induzidos pela radiação UVB. No presente trabalho, os danos induzidos por UVB levaram a perda da viabilidade celular das duas linhagens de células estudadas (L929 e HaCaT), e esta perda foi proporcional a dose de radiação. Enquanto que, a radiação UVA não induziu perda da viabilidade a nenhuma linhagem celular. O parâmetro viabilidade celular pode vir a ser utilizado para avaliar o potencial fotoprotetor de protetores solares contra os efeitos da radiação UVB.

Os compartimentos das células e organelas são delimitados por biomembranas constituídas por uma bicamada de fosfolipídeos, mas apresentam também colesterol, proteínas e carboidratos. Os fosfolipídeos são moléculas anfipáticas que possuem uma porção polar formada por glicerol ou esfingosina, um grupo fosfato e outra molécula orgânica. A porção apolar é composta por ácidos graxos saturados e insaturados. As radiações UVA e UVB podem induzir a formação de EROs nas células, e dentre as moléculas que podem ser lesadas pelas EROs, os lipídeos insaturados são os mais suscetíveis à oxidação, até mais que o DNA. Os lipídeos, ao contrário do DNA e de proteínas, não absorvem diretamente a radiação UVB e ao menos a radiação UVA, sendo atacados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A

peroxidação lipídica inicia pelo ataque à bicamada lipídica por qualquer espécie reativa de oxigênio ou nitrogênio, com energia suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio bisalílico de ácido graxo poliinsaturado. Após iniciado o processo, este torna-se autocatalítico com a formação de hidroperóxidos e o processo é finalizado com a formação de produtos secundários, como aldeídos (MDA), cetonas e epóxidos (OLIVIER et al., 2016; LIMA, ABDALLA, 2001; POLTE, TYRRELL, 2004; HIDRATA, SATO, SANTOS, 2004; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007; ALONSO et al., 2009).

As linhagens de células L929 e HaCaT foram expostas à diferentes doses de radiação UVA e nenhuma dessas culturas sofreram a oxidação dos lipídeos de membrana, de forma a liberar quantidades de MDA suficientes para sua quantificação, mesmo quando expostas à doses de radiação superiores a 20 J/cm². As células podem gerar diferentes espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, algumas dessas espécies podem reagir com os lipídeos enquanto outras não apresentam essa capacidade (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). O que pode ter ocorrido foi que as linhagens de células, expostas à radiação UVA com pico máximo de radiação no comprimento de onda 370 nm, não tenham gerado EROs suficientes para reagir com os lipídeos das membranas celulares.

Por outro lado, tanto as células de L929 quanto as células de HaCaT, expostas à UVB, sofreram o processo de lipoperoxidação, sendo que a linhagem L929 mostrou maior produção de MDA/TBA em relação a HaCaT, e essa produção foi dose dependente até a dose de 30 J/cm² de UVB. Acima dessa dosagem foi observada uma diminuição na quantidade do aldeído que pode ser resultado da formação de uma variedade de adutos mutagênicos que o MDA forma com o DNA. Maior destaque para o aduto resultante da reação com resíduos de guanina, considerados os mais mutagênicos as células sob condições de estresse oxidativo. O MDA também pode ligar-se a resíduos de lisina de proteínas, e em menor extensão à resíduos de histidina, tirosina, arginina e metionina (FENG et al., 2006; DURYEE et al., 2010; SINGH, KAPOOR, BHATNAGAR, 2015). Assim, a dose de radiação UVB selecionada e responsável pela formação da MDA, em quantidade suficiente para ser utilizada como um parâmetro para avaliação da eficácia de protetores solares com diferentes FPSs, foi de 30 J/cm², dose esta muito superior aquela utilizada para indução da perda da viabilidade celular (0,5 J/cm²).

Karthikeyan et al. (2016) também avaliaram os parâmetros biológicos viabilidade celular e peroxidação lipídica em células de fibroblastos (utilizou células primárias de

fibroblastos dérmicos humanos adultos – HDFa). E observaram que a exposição à radiação UVB foi citotóxica e induziu peroxidação lipídica significativa nas células HDFa, como foi observado nesse trabalho para células de L929.

A DCFH₂-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares em 2',7' - diclorodihidrofluoresceína (DCH₂), composto que não atravessa a membrana celular, acumulando-se no interior das células. Na presença de EROs, particularmente peróxidos, a DCFH₂ é oxidada a 2',7' - diclorofluoresceína que apresenta fluorescência intensa (BASS et al., 1983). As linhagens celulares (L929 e HaCaT) foram expostas às radiações UVA e UVB e, em seguida, tratadas com a sonda. As EROs formadas nesse processo foram capazes de oxidar a sonda intracelularmente e gerar o composto fluorescente. As células de HaCaT mostraram uma relação dose dependente entre a dose de radiação UVB e o aumento da fluorescência, mas quando estas células foram protegidas com os protetores das marcas A e B, com diferentes valores de FPSs, não foi possível observar diferença de proteção em função do fator de proteção solar. No entanto, para a radiação UVA, as linhagens HaCaT e L929 mostraram que o aumento da fluorescência foi dependente da dose de radiação e as células HaCaT foram as escolhidas. Liu et al. (2011) também observaram um aumento na geração de EROs em células HaCaT expostas à radiação UVA.

Ao final desta fase foi possível estabelecer os ensaios *in vitro* e as linhagens celulares a serem aplicadas no estudo de avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares. A linhagem de células L929 e os parâmetros biológicos, viabilidade celular e peroxidação lipídica, foram selecionados para avaliar a eficácia fotoprotetora sob exposição à radiação UVB. A linhagem HaCaT foi a selecionada para avaliar a eficiência fotoprotetora dos protetores solares contra a radiação UVA, usando como parâmetro a medida da quantidade de fluorescência gerada pela oxidação da sonda DCFH₂-DA sob ação das EROs induzidas pelos raios UVA.

O desenvolvimento de ensaios *in vitro* não tem o objetivo de substituir os ensaios *in vivo*, mas dar informações complementares a cerca da eficiência fotoprotetora dos protetores solares, principalmente durante a preparação de novas formulações fotoprotetoras, visando escolher aquela mais promissora à proteção solar.

Protetores solares comerciais de duas marcas diferentes (A e B) foram escolhidos para ter suas eficácias fotoprotetoras avaliadas pelos ensaios *in vitro* cujas condições ideais

foram previamente definidas. Estes produtos diferenciam-se na composição de filtros UV orgânicos e no tipo de veículos utilizados.

Uma análise qualitativa dos protetores solares comerciais, aplicando a técnica de CLAE, confirmou a composição de filtros orgânicos mencionados nos rótulos dos produtos. Este fato certifica que os fotoprotetores selecionados para o estudo contêm moléculas com capacidade de absorver e/ou refletir a radiação UVA e UVB (ROMANHOLE et al., 2016) responsáveis pelos fatores de proteção (SERPONE, DONDI, ALBINI, 2007) estabelecidos por métodos *in vivo* (FPS, IPD, PPD) (COLIPA, 2006; MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; PELIZZO et al., 2012). Assim, eles podem atuar como formulações padrões para o desenvolvimento de novos procedimentos *in vitro* de avaliação do potencial fotoprotetor.

A eficácia fotoprotetora dos protetores solares com diferentes FPSs da marca A e dos protetores com diferentes FPSs/PPDs da marca B foi determinada nas condições ideais de ensaio pré-estabelecidas.

A quantificação da viabilidade celular das células L929, expostas ou não à radiação UVB e protegidas ou não com os protetores solares das marcas A e B, mostrou que os produtos da marca A foram menos eficientes em proteger as células da perda da viabilidade quando comparados aos produtos da marca B. Considerando que os valores de FPSs quantificam somente os danos induzidos pela radiação UVB (PELIZZO et al., 2012; SCHALKA, dos REIS, 2011) e as células foram irradiadas somente com raios UVB, era de se esperar que produtos com o mesmo FPS tivessem o mesmo desempenho na proteção das células contra os efeitos danosos dos raios UVB. A diferença de resultados entre os produtos das marcas A e B pode ser decorrente do tipo de veículo utilizado no preparo das formulações de cada marca. Os ingredientes ativos de protetores solares (filtros orgânicos e inorgânicos) podem interagir com excipientes/veículos, resultando em alterações na qualidade, segurança e eficácia fotoprotetora do produto final (MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; SAMBANDAN, RATNER, 2011). Assim, os resultados sugerem que este tipo de ensaio pode ser utilizado para avaliação da eficiência fotoprotetora de protetores solares durante a fase de desenvolvimento.

Os lipídeos das membranas das células L929, expostos à radiação UVB, sofreram o processo de peroxidação lipídica. Como os lipídeos não absorvem essa radiação, o processo oxidativo foi iniciado pelas EROs geradas por componentes da célula expostos à radiação. A peroxidação lipídica foi quantificada pela reação do aldeído MDA formado via decomposição

de produtos do processo oxidativo primário e secundário. O MDA prontamente participa da reação de adição nucleofílica com o ácido tiobarbitúrico, na proporção de 1:2, em condições reacionais de pH ácido e alta temperatura. No entanto, apenas alguns produtos da peroxidação lipídica geram o MDA, e este composto não é o único produto final da formação e decomposição de peróxidos graxos, e muito menos é uma substância gerada exclusivamente por meio da peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2008; ALONSO et al., 2009; KAMEL, MOSTAFA, 2015).

A quantidade de MDA foi determinada a partir da curva de calibração construída relacionando a medida da fluorescência e as concentrações conhecidas de malondialdeído liberado pela hidrólise do padrão 1,1,3,3-tetraetoxipropano, nas condições ácidas do ensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem de MDA/TBA produzido na fração sobrenadante do homogeneizado celular. Para obter valores mais elevados de MDA/TBA, visando estabelecer um ensaio mais preciso para diferenciar a eficiência fotoprotetora de protetores solares com diferentes FPSs rotulados, as células foram expostas a 30 J/cm² de radiação UVB, dose 60 vezes superior aquela usada para obter uma diminuição de 50% da viabilidade celular. Nesta dose provavelmente deve ter ocorrido a morte de todas as células, e como o MDA não é gerado só pela peroxidação lipídica, MDA de outras fontes podem ter sido quantificado e relacionado ao processo oxidativo de lipídeos da membrana. O método de quantificação do MDA não é absoluto, mas permite a comparação de amostras de mesma composição e isto foi respeitado no ensaio. O MDA foi dosado no tampão de Hank utilizado para irradiação das células L929, expostas a uma mesma dose de radiação UVB, o que diferenciou de amostra para amostra foi o uso de protetores solares de diferentes FPSs (marcas A e B) que não entraram em contato com as células (aplicados na placa de quartzo).

Os resultados obtidos mostraram que a quantidade de MDA formado nas células expostas à radiação UVB foi proporcional aos valores de FPSs e FPSs/PPDs. Assim, foi possível observar uma relação linear entre os valores de MDA/TBA formados versus o FPS indicado nos rótulos dos protetores solares para os produtos de ambas as marcas (A e B).

O protetor solar da marca B com FPS-30 e PPD-15 foi o único produto dentre todos os analisados que não protegeu as células contra a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVB. Esse produto está na forma de creme enquanto todos os outros são loções, possui dois filtros UV, EHS e HMS, que não foram incluídos nos demais fotoprotetores. A explicação para a ineficácia do produto pode ser devido à instabilidade física proporcionada pela exposição da formulação creme a 30 J/cm² de radiação UVB, como também não pode ser

descartada a possibilidade de instabilidade química dos filtros UV, EHS e HMS, induzida pelos raios UVB, que levou a uma instabilidade física da formulação proporcionando perda de eficácia.

No que diz respeito à determinação de EROs intracelulares, o ensaio *in vitro* mostrou que os protetores solares comerciais de ambas as marcas (A e B) foram eficazes na proteção das células HaCaT contra a indução de espécies reativas de oxigênio pela radiação UVA, o que confirma o potencial de absorção destas formulações fotoprotetoras.

Uma relação linear inversa foi observada entre a formação de EROs e os valores de FPSs ou PPDs oferecidos pelos protetores solares da marca B (dados não mostrados). Os valores dos coeficientes de correlação obtidos (R) mostraram que a melhor relação linear ocorreu entre os valores de PPDs (R = 0,9996), ao invés dos valores de FPSs (R = 0,9911) e a geração de EROs.

Os produtos da marca B contêm, além dos filtros UV orgânicos e inorgânico que absorvem a radiação UVA-2 e a avobenzona, a presença de filtros orgânicos exclusivos com absorção na região UVA-1 e UVA-2. Assim, esses protetores solares apresentam uma quantidade maior de filtros orgânicos com absorção referente a radiação UVA-1 e UVA-2 que os produtos da marca A. Isto explica a existência de uma relação linear inversa entre a formação de EROs e os valores de PPDs ou FPSs para os produtos da marca B, que não foi encontrada para os produtos da marca A.

Os três ensaios *in vitro*, baseados em parâmetros biológicos que se alteram com a radiação UV, demonstraram ser precisos e exatos. Os resultados mostraram que os ensaios *in vitro* podem ser promissores para diferenciar os níveis de proteção fornecidos pelas formulações com diferentes valores de FPSs e de PPDs, principalmente para serem utilizados no desenvolvimento de novas formulações fotoprotetoras e até mesmo para avaliação da eficácia desses produtos durante os estudos de estabilidade.

A segunda etapa desse projeto consistiu em desenvolver um ensaio *in vitro* que permitisse avaliar a capacidade fotoprotetora de protetores solares na região de absorção UVA-1 usando como alvo biológico uma enzima chave na resposta imunológica, conhecida como calcineurina (SMIT et al., 2008). Esta fosfatase foi selecionada como marcador biológico, pois trabalhos da literatura demonstram que doses clinicamente relevantes de radiação UVA-1 suprimem drasticamente e de modo dose-dependente a sua atividade (MUSSON et al., 2011; SMIT et al., 2010; MUSSON, MULLENDERS, SMIT, 2012).

O mecanismo de ação biológico dessa enzima consiste na desfosforilação citoplasmática de seu substrato primário NFAT, com subsequente translocação nuclear desse

substrato e a ativação transcricional de vários genes chaves para ativação de células T (SOMMERER et al., 2012; SMIT et al., 2008; SMIT et al., 2010; MUSSON et al., 2011). Nesse processo de desfosforilação ocorre liberação de fosfato que *in vitro* é quantificado para medida da atividade enzimática (SELAR et al., 2006; SMIT et al., 2010).

Na literatura, técnicas de medida de radioatividade (FRUMAN et al., 1996), fluorimétrica (ROBERTS, POHL, GOOCK, 2008) e espectrofotométrica (SELLAR et al., 2006; SMIT et al., 2008; SMIT et al., 2010; MUSSON et al, 2011; MUSSON, MULLENDERS, SMIT, 2012) são reportadas para a quantificação de fosfato inorgânico. Dentre esses métodos de quantificação, o mais utilizado é o espectrofotométrico empregando o reagente verde de malaquita. Este ensaio é considerado vantajoso por não utilizar substratos radioativos de alto custo que produzem resíduos também radioativos e nocivos (FISHER, HIGGINS,1994) e não emprega substrato marcado com fluorescência, considerado de difícil aquisição por não ser um produto comercializável, cuja aquisição demanda de parceria com alguma instituição que o sintetize, como verificado no trabalho de Roberts et al. (2008).

Diante disso, a atividade da enzima calcineurina foi quantificada colorimetricamente pelo ensaio do corante verde de malaquita semelhante à técnica empregada por SELLAR et al. (2006). Esse corante tem sido usado na detecção do fosfato liberado da ação de diferentes enzimas sobre uma variedade de substratos endógenos como proteínas e lipídeos e, de substratos sintéticos como peptídeos fosforilados nos aminoácidos Ser, Thr e Tyr, glucanos fosforilados e fosfolipídeos (SHERWOOD et al., 2013) para medida da atividade de diversas fosfatases (ZHU et al., 2009; GELADOPOULOS, SOTIROUDIS, EVANGELOPOULOS, 1991).

O primeiro passo para o desenvolvimento do ensaio de avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares contra radiação UVA-1 foi estabelecer as condições de quantificação do fosfato inorgânico usando o verde de malaquita. O micrométodo proposto por Hess e Derr (1975) não permitiu a quantificação precisa e exata de pequenas quantidades de fosfato. Quando o procedimento de Hess e Derr (1975) foi empregado não foi observado diferença de absorvância entre as diferentes concentrações de fosfato analisadas e o branco da reação (ausência de fosfato). Desta forma, tentou-se adaptar os procedimentos de quantificação de fosfato em tubos (volumes reacionais finais de 2,5 mL e 0,9 mL) que

também empregavam o reagente verde de malaquita, descritas na literatura (CHAN, DELFERT, JUNGER, 1986; FENG et al., 2011), mas sem sucesso.

O procedimento em tubos de quantificação de fosfato proposto por Baykov, Evtushenko e Avaeva (1988) foi adaptado para microplaca de 96 poços. Uma relação linear foi obtida entre as quantidades de fosfato, na faixa de 250 a 2000 pmol, e absorvância em 620 nm, quando foi empregada no meio reacional a proporção de 50 μ L de amostra (solução padrão de fosfato), para 93 μ L de água miliQ e 12 μ L de reagente de verde de malaquita. A quantificação de baixas quantidades de fosfato foi possível pelo uso do corante verde de malaquita que apresenta acentuada mudança em sua absorção máxima, após exposição a fosfomolibdato (ITAYA, UI, 1966).

Após definição das condições ideais de quantificação de fosfato em baixa concentração e em pequeno volume de meio reacional, as condições reacionais para a medida da atividade da calcineurina foram estabelecidas usando calcineurina comercial cuja atividade enzimática era conhecida. A concentração do substrato (fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado) de 7,5 μ M, a temperatura de incubação de 30°C e o tempo de reação de 30 minutos utilizados foram aqueles recomendados pelo fornecedor do Kit de medida da calcineurina e pelo trabalho de Sellar et al. (2006). Experimentos foram realizados para determinar, nas condições do ensaio enzimático, as quantidades de atividade da calcineurina que podiam estabelecer uma relação linear com as quantidades de fosfato liberadas, e também para saber qual a menor e a maior quantidade da calcineurina que poderia ser determina com precisão e exatidão.

Os resultados serviram também para nortear os experimentos com cultura de células, como por exemplo, o número de células que deveriam ser expostas à radiação UVA-1 para que no final tivesse uma quantidade de calcineurina que permitisse a medida da atividade enzimática com precisão.

Estabelecidas as condições reacionais de quantificação de fosfato e as condições de determinação da atividade da calcineurina, o outro passo foi a escolha da cultura celular para o desenvolvimento do ensaio *in* vitro para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares contra a radiação UVA-1.

A enzima calcineurina está presente na pele do sistema tegumentar (FRUMAN et al., 1996; SMIT et al., 2008; SMIT et al., 2010), é expressa por melanócitos, queratinócitos e fibroblastos, onde a enzima foi mais expressa, conforme os resultados de Smit et al. (2008).

80

Os dados da literatura mostram que os fibroblastos HDFn primários são as células de mais fácil crescimento onde a calcineurina é bem expressa. Com base nessas informações, os fibroblastos HDFn foram as células escolhidas para o desenvolvimento do ensaio *in vitro*. Estas células mostram um rendimento médio de 4,5 x 10^4 céls/cm², crescimento considerado rápido (em torno de 5 dias) ao comparar com as culturas de HDFa (média de 7 a 9 dias para crescimento) que também foram testadas.

O meio de cultivo, DMEM alta glicose, Gibco[®], foi utilizado para o crescimento das células HDFn, o que permitiu alto rendimento celular com baixo custo. Um litro desse meio (DMEM alta glicose, Gibco[®]) demandou um investimento 89% e 88% menor quando comparado com os meios 106 suplementado com o kit LSGS (Gibco[®]) e FGM[®]-2 SingleQuots (Lonza[®]), respectivamente.

Inicialmente, a tentativa em medir a atividade da calcineurina foi realizada com as culturas de células HDFn cultivadas em monocamadas. Estas culturas foram expostas ou não a diferentes doses de radiação UVA-1 e protegidas ou não com os protetores solares comerciais (marcas A e B) e posteriormente lisadas para quantificação da atividade enzimática. No entanto, a quantidade de atividade da calcineurina obtida foi muito baixa, pois o número de células que era possível ser adicionada a cada poço não foi suficiente para ter uma quantidade de enzima satisfatória para que sua atividade enzimática fosse determinada pelo método de quantificação de fosfato estabelecido. O número de células aderidas por amostra/poço foi de 8 x 10^5 , o que correspondeu a um teor de proteínas de $107,58\pm3,41$ µg/mL, concentração considerada baixa para determinação da atividade de calcineurina, segundo dados de Fruman et al. (1996).

Diante disso, outra tentativa de dosagem da atividade da calcineurina em culturas de células HDFn correspondeu em expor à radiação UVA-1 o lisado dessas células, ou seja, as células foram primeiramente submetidas ao processo de lise e o lisado obtido foi exposto à radiação UVA-1. O tampão de lise também foi modificado, além de inibidores de proteases foi adicionado o ácido ascórbico que segundo Sellar et al. (2006) e Fruman et al. (1996), era o componente capaz de preservar a atividade da enzima até a realização do experimento. Uma vez que, esta enzima pode sofrer rápido processo de proteólise, reduzindo sua atividade e consequentemente, interferindo na sua aplicação como ensaio de avaliação de eficácia fotoprotetora.
O número de células estabelecidas na obtenção do lisado, pelo processo de lise mecânica, foi de 16×10^5 , cuja quantidade de proteína correspondeu a $417,55 \pm 8,79 \mu g/mL$. Esta concentração de proteínas está de acordo com a quantidade de proteína ideal de 100-500 $\mu g/mL$, estabelecida por Fruman et al. (1996), para a quantificação da atividade da calcineurina. O procedimento de lise mecânica (Pellet Petle Motor Kontes, Sigma-Aldrich, EUA) foi mais eficaz no rompimento das membranas celulares para liberar a calcineurina intracelular ao comparar com os ciclos de congelamento-descongelamento (nitrogênio líquido-30°C).

O meio reacional final estabelecido para a quantificação da atividade de calcineurina nos lisados celulares apresentou: concentração de íons cálcio 2,5 vezes superior a quantidade proposta por Sellar et al. (2006) e equivalente a quantidade usada por Fruman et al. (1996), uma vez que a enzima calcineurina é dependente de íons cálcio para sua ativação (FRUMAN et al., 1996; SELLAR et al., 2006; ROBERTS, POHL, GOOCH, 2008; MUSSON et al., 2011). A presença da calmodulina também é essencial, pois liga-se reversivelmente a subunidade catalítica A da calcineurina (CnA), promove o deslocamento do peptídeo autoinibitório proporcionando uma mudança conformacional no sítio ativo da enzima resultando na sua ativação (LI, RAO, HOGAN, 2011).

A adição dos ácidos inibitórios (ácido ocadaico e ácido abscísico) também é de fundamental importância no meio reacional para a inativação das fosfatases interferentes da reação. Uma vez que, o ácido ocadaico atua como inibidor das fosfatases serinas/treoninas PP1 e PP2A, sendo conhecido como toxina natural de origem marinha e considerado um potente agente tumoral (KRISTELLER, 2007; FRUMAN et al., 1996) e o ácido abscísico é o responsável pela inibição da fosfatase PP2C, caracterizado como hormônio vegetal (LIM et al., 2012; WANG et. al., 2014). Com isso, as três das quatro classes de fosfatases citoplasmáticas serinas/treoninas presentes nas células de mamíferos (FRUMAN et al., 1996), e que poderiam interferir na quantificação da calcineurina, foram inibidas. E por último, a diluição do sobrenadante proveniente do lisado celular contribuiu para diminuir a interferência de fosfatos da célula e não equivalente ao produto da reação enzimática entre a calcineurina e seu substrato.

A curva dose resposta obtida com os lisados das células HDFn, expostas a doses crescente de radiação UVA-1, demonstrou uma redução dose dependente na atividade da calcineurina, semelhante ao resultado obtido por Smit et al. (2010) com células de fibroblastos. Os resultados de redução de atividade obtidos nesse trabalho estão próximos ao

encontrado por Smit et al. (2010), em que fibroblastos expostos a 22,5 J/cm² de radiação UVA-1 tiveram uma proteção de 28,5% na atividade da calcineurina.

A redução da atividade da calcineurina dos lisados das células HDFn foi acompanhada do aumento na formação de EROs pela exposição à radiação UVA. A radiação UVA é o componente oxidante da luz solar (SMIT et al., 2010) e sua ação é indireta pela geração de EROs (MANCEBO et al., 2014). Trabalhos da literatura relatam a inativação da enzima por radicais ânions superóxidos e oxigênio singleto e pela espécie reativa não radicalar, peróxido de hidrogênio (BOGUMIL et al., 2000; SOMMER et al., 2000; MUSSON et al., 2011). Desta forma, as EROs geradas podem ter contribuído para a redução da atividade da enzima calcineurina (SMIT et al., 2010; MUSSON et al., 2011). A inativação da calcineurina na pele pela radiação UVA-1 em doses terapêuticas pode assemelhar-se à ação de inibidores da calcineurina (CnI), usados como drogas imunossupressoras no tratamento de pacientes transplantados (SMIT et al., 2010).

As marcas de protetores solares comerciais analisadas (A e B) responderam de modos distintos a influência da radiação UVA-1 sobre a atividade da calcineurina. Os protetores solares da marca A que apresentam menor quantidade de filtros UV que absorvem a fração UVA-1, não foram capazes de proteger o lisado de células HDFn da perda de atividade da calcineurina induzida pela radiação UVA-1. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois esses protetores solares não foram adicionados dos diferentes filtros orgânicos que absorvem na região do UVA-1.

Por outro lado, os protetores solares da marca B que possuem em sua composição os filtros orgânicos contra a radiação UVA-1, que não estão presentes nos produtos da marca A, foram capazes de proteger os lisados celulares da redução de atividade de calcineurina provocada pela fração UVA-1. Com exceção do produto com FPS-30/PPD-15 cuja porcentagem de atividade enzimática foi estatisticamente igual ao do controle irradiado, apesar de ter em sua composição os filtros UVA-1. O que pode ter ocorrido com este produto foi que a quantidade de filtros UVA-1 adicionada a esta formulação (FPS-30/PPD-15) foi muito inferior (ao comparar com as demais formulações da marca B), não sendo capaz de absorver eficientemente a radiação UVA-1 de modo que proporcionasse a proteção da atividade da enzima calcineurina. Outra explicação para essa ineficácia pode ser devido à uma instabilidade física gerada pela exposição da formulação creme a 24 J/cm² de radiação UVA-1. E por fim, esta ausência de proteção pode também estar relacionada ao veículo utilizado na incorporação dos filtros. Uma vez que, o veículo empregado difere dos demais protetores da

mesma marca e este fato pode resultar em alterações na qualidade, segurança e eficácia fotoprotetora do produto final (MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; SAMBANDAN, RATNER, 2011).

Os protetores com FPS-40/PPD-25 e FPS-60/PPD-41 foram capazes de proteger, aproximadamente, em 36% a perda da atividade da calcineurina induzida pela radiação UVA-1, porém não houve diferença estatística entre os dois produtos, apesar de haver diferença em valores de PPDs.

A quantidade de filtros orgânicos UVA-1 adicionada aos protetores solares da marca B permitiu ver diferença de proteção entre o fotoprotetor com FPS-30/PPD-15 e os protetores com FPS-40/PPD-25 e FPS-60/PPD-41, mas não entre os produtos com FPS40/PPD-25 e FPS-60/PPD-41. A ausência de diferença em proteção contra UVA-1 observada para esses dois produtos pode ser devido à incorporação da mesma quantidade de filtros UVA-1 nos dois produtos. Os diferentes valores de PPDs, 25 e 41, determinados por ensaios *in vivo* pode ser devido à diferentes quantidades de filtros UVA-2 adicionadas à estes produtos, principalmente de filtros inorgânicos que também refletem e absorvem na faixa de UVA-2. Os filtros UVA-2 também contribuem para o aumento nos valores de PPDs.

Com estes resultados foi possível demonstrar que o ensaio de medida da atividade de calcineurina foi seletivo para avaliar produtos fotoprotetores ricos em filtros UVA-1. Uma vez que, ao analisar os protetores solares da marca A verificou que não houve proteção da atividade enzimática. Enquanto que, os protetores da marca B, com maiores valores de PPD, demonstraram eficiência em proteger as células HDFn da inibição da atividade da calcineurina, ato semelhante aos inibidores comerciais de calcineruina.

O ensaio de quantificação enzimática *in vitro* foi avaliado quanto a reprodutibilidade dos resultados utilizando lisados provenientes de ciclos de crescimento celular diferentes e com execução dos procedimentos em dias distintos (n=4). Esses dados permitiram uma avaliação do potencial fotoprotetor dos protetores solares comerciais expostos à radiação UVA-1, à nível de atividade de calcineurina medida em células da pele, mas não pôde ser relacionado aos valores de PPDs.

Com isso, sugere-se que este ensaio *in vitro* possa ser utilizado para avaliação da eficácia fotoprotetora de formulações adicionadas de filtros orgânicos UVA-1 durante o desenvolvimento dessas formulações, também para avaliar a capacidade de extratos vegetais e de novos filtros UV em absorverem na faixa de UVA-1 e impedirem a perda da atividade da

calcineurina. A inibição da atividade dessa enzima pode levar a supressão do sistema imune pela exposição à radiação solar (SMIT et al., 2010).

	85
 Conclusões	

6. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, as principais conclusões foram:

✓ Os protetores solares comerciais tiveram suas diferentes composições em filtros UV orgânicos confirmadas pela técnica de CLAE.

✓ O sistema de irradiação empregado foi qualificado de forma que contribuiu adequadamente para a execução dos ensaios *in vitro*.

✓ As maiores alterações observadas em células de L929 corresponderam a viabilidade celular e a peroxidação lipídica, induzidas por 0.5 J/cm^2 e 30.0 J/cm^2 de radiação UVB, respectivamente.

 ✓ As células de HaCaT corresponderam a linhagem que melhor respondeu a formação de EROs, induzidas por 20 J/cm² de radiação UVA.

✓ Os protetores solares das marcas A e B, com fatores de proteção diferentes, foram capazes de proteger a viabilidade das células L929, expostas a 0,5 J/cm² de radiação UVB.

✓ A proteção fornecida às células L929, expostas à 30 J/cm² de radiação UVB, contra a indução da peroxidação lipídica foi inversamente proporcional aos valores de FPSs e FPSs/PPDs dos protetores solares comerciais.

✓ Os protetores solares comerciais de ambas as marcas (A e B) foram eficazes na proteção das células HaCaT contra a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzidas por 20 J/cm² de radiação UVA.

✓ Os ensaios *in vitro* baseados nos parâmetros biológicos, viabilidade celular, peroxidação lipídica e formação de EROs intracelulares, mostraram-se precisos e exatos. Sendo que, o uso do extrato etanólico do epicardo de *Garcinia brasiliensis* e da astaxantina, em concentrações diferentes, confirmaram a seletividade dos ensaios para as radiações UVB e UVA, respectivamente.

 ✓ A quantificação de fosfato foi estabelecida com a aplicação do método adaptado de Baykov, Evtushenko e Avaeva (1988) que mostrou-se linear e preciso.

✓ As condições ideais para medida da atividade de calcineurina foram padronizadas para o uso de 7,5 μ M de substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado, temperatura de 30°C, tempo de reação de 30 minutos, diluição do homogeneizado de células HDFn para 1:2, adição dos ácidos inibitórios ocadaico e abscísico e adição de 2,5 mM de CaCl₂ no tampão ensaio 2x.

 ✓ O homogeneizado de células HDFn permitiu uma redução na atividade de calcineurina de forma linear com o aumento da radiação UVA-1. ✓ Os protetores solares da marca A, com menor quantidade de filtros UV que absorvem a fração UVA-1, não foram capazes de proteger o lisado de células HDFn da perda de atividade da calcineurina induzida pela radiação UVA-1.

✓ Os protetores solares da marca B, com os maiores valores de PPDs e com os filtros orgânicos específicos que absorvem a radiação UVA-1, foram capazes de proteger os lisados celulares da redução de atividade de calcineurina provocada pela fração UVA-1.

✓ Com estes resultados foi possível demonstrar que o ensaio de medida da atividade de calcineurina foi seletivo para avaliar produtos fotoprotetores ricos em filtros UVA-1.

A partir da proibição pela União Europeia ao uso de animais para avaliação de segurança e eficácia de matérias-primas e produtos cosméticos acabados, o desenvovlimento de métodos alternativos *in vitro* tornou-se realidade, com o intuito de reduzir/substituir o uso de animais em pesquisa.

A aplicação de culturas de células como ensaios *in vitro* para avaliação da eficácia fotoproterora de compostos ou formulações estão começando a serem pesquisados, segundo alguns relatos da literatura. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho tendem a contribuir significativamente para essa área de pesquisa, com o desenvolvimento de ensaios *in vitro* em que alterações biológicas em células cutâneas foram utilizadas como parâmetros de avaliação da eficácia fotoproteotra de protetores solares. E especialmente, o desenvolvimento de um ensaio *in vitro* para avaliação da eficácia de fotoproteotres expostos a radiação UVA-1, ainda não descrito na literatura.

Referências

7. Referências

ALONSO, C.; BARBA, C.; RUBIO, L.; SCOTT, S.; KILIMNIK, A.; CODERCH, L.; NOTARIO, J.; PARRA, J. L. An *ex vivo* methodology to assess the lipid peroxidation in stratum corneum. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 97 (2009) 71-76.

ARGS. Australian Regulatory Guidelines for Sunscreens. Version 1.0 (2012). Disponível em: < https://www.tga.gov.au/book/9-permitted-ingredients#s91 >. Acesso em: 12 ago. 2016.

ARIMON, M.; TAKEDA, S.; POST, K. L.; SVIRSKY, S.; HYMAN, B. T.; BEREZOVSKA, O. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. **Neurobiology of Disease**, 84 (2015) 109-119.

ARORA, S.; TYAGI, N.; BHARDWAJ, A.; RUSU, L.; PALANKI, R.; VIG, K.; SINGH, S. R.; SINGH, A. P.; PALANKI, S.; MILLER, M. E.; CARTER, J. E.; SINGH, S. Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11 (2015) 1265-1275.

BACQUEVILLE, D.; DOUKI, T.; DUPRAT, L.; REBELO-MOREIRA, S.; GUIRAUD, B.; DROMIGNY, H.; PERIER, V.; BESSOU-TOUYA, S.; DUPLAN, H. A new hair follicle-derived human epidermal model for the evaluation of sunscreen genoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 151 (2015) 31-38.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 86 (2011) 732-742.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29 (2006) 113-123.

BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, 130 (1983) 1910-1917.

BAYKOV, A. A.; EVTUSHENKO, O. A.; AVAEVA, S. M. A Malachite green procedure for Orthophosphate determination and its use in Phosphatase-based enzyme Immunoassay. **Analytical Biochemistry**, 171 (1988) 266-270.

BERRA, C.M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. Estresse oxidative, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo cellular. **Química Nova**, 29 (2006) 1340-1344.

BOGUMIL, R.; NAMGALADZE, D.; SCHAARSCHMIDT, D.; SCHMACHTEL, T.; HELLSTERN, S.; MUTZEL, R.; ULLRICH, V. Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. **European Journal of Biochemistry**, 267 (2000) 1407-1407.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72 (1976) 248-254.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento Técnico Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes. RDC Nº47, 2006.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology**, 84 (2008) 539-549.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. European Academy of Dermatology and Venereology, 17 (2003) 663-669.

CAYROL, C.; SARRAUTE, J.; TARROUX, R.; REDOULES, D.; CHARVERON, M.; GALL, Y. A mineral sunscreen affords genomic protection against ultraviolet (UV) B and UVA radiation: in vitro and in situ assays. **British Journal of Dermatology**, 141 (1999) 250-258.

CEN, J.; WANG, M.; JIANG, G.; YIN, Y.; SU, Z.; TONG, L.; LUO, J.; MA, Y.; GAO, Y.; WEI, Q. The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporine A and tacrolimus. **Biochimie**, 111 (2015) 119-124.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, 157 (1986) 375-380.

CHEN, Y.; ZHAO, M.; FU, M.; YAO, W.; TANG, C. The role of calcineurin in the lung fibroblasts proliferation and collagen synthesis induced by basic fibroblast growth factor. **Chinese Medical Journal**, 116 (2003) 857-862.

CHISVERT, A.; TARAZONA, I.; SALVADOR, A. A reliable and environmentallyfriendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products. **Analytica Chimica Acta**, 790 (2013) 61-67.

COLIPA, C.S., JCIA, CTFA, International sun protection factor (SPF) test method, COLIPA Guideline, 2006.

CONNOLLY, K.; MANDERS, P.; EARLS, P.; EPSTEIN, R. J. Papillomavirusassociated squamous skin cancers following transplant immunosuppression: one Notch closer to control. **Cancer Treatment Reviewss**, 40 (2014) 205-214.

COPE, A. P. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. Arthritis Research, 4 (2002) 197-211.

COSTA, K. C. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial fotoprotetor e fotoquimioprotetor da fração purificada de *Inga edulis* (Ingá). 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CURSINO, A. C. T.; LISBOA, F. S.; PYRRHO, A. S.; SOUSA, V. P.; WYPYCH, F. Layered double hydroxides intercalated with anionic surfactants/benzophenone as potential materials for sunscreens. **Journal of Colloid and Interface Science**, 397 (2013) 88-95.

DAMIANI, E.; ULLRICH, S. E. Understanding the connection between plateletactivating fator, a UV-induced lipid mediator of inflammation, imune suppression and skin câncer. **Progress in Lipid Research**, 63 (2016) 14-27.

de PAULA, L. R.; PARUSSULO, A. L. A.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Evaluation of Sun Protection Factor of Cosmetic Formulations by a Simple Visual *In Vitro* Method Mimicking the *In Vivo* Method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 101 (2012) 726-732.

DELGADO, R. M. A. Isolamento e caracterização de fosfatases do tipo 2C e proteínas PYR/PYL em *Armeria welwitschii.* 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal, 2011.

DING, W.; HUDSON, L. G.; SUN, X.; FENG, C.; LIU, K. J. As (III) inhibits ultravioleta radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair via generation of nitric oxide in human keratinocytes. Free Radical Biology and Medicine, 45 (2008) 1065-1072.

DURYEE, M. J.; KLASSEN, L. W.; SCHAFFERT, C. S.; TUMA, D. J.; HUNTER, C. D.; GARVIN, R. P.; ANDERSON, D. R.; THIELE, G. M. Malondialdehyde–acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, 49 (2010) 1480–1486.

FENG, J.; CHEN, Y.; PU, J.; YANG, X.; ZHANG, C.; ZHU, S.; ZHAO, Y.; YUAN, Y.; YUAN, H.; LIAO, F. An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. **Analytical Biochemistry**, 409 (2011) 144-149.

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A.; CUNHA, T. M.; dos SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 131 (2014) 65-73.

FISHER, D.; HIGGINS, T. J. A sensitive, high-volume, colorimetric assay for protein phosphatases. **Pharmaceutical Research**, 11 (1994) 759-763.

FORTE, A. L. S. A. Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

FRUET, A. C. Avaliação do efeito fotoprotetor de compostos fenólicos sobre culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB. 2015. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FRUMAN, D. A.; PAI, S.; KLEE, C. B.; BURAKOFF, S. J.; BIERER, B. E. Measurement of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. **Methods: A companion to Methods in Enzymology**, 9 (1996) 146-154.

GAUSE, S.; CHAUHAN, A. Broad spectrum UV protection by crystalline organic microrod sunscreens. International Journal of Pharmaceutics, 489 (2015) 30-44.

GELADOPOULOS, T. P.; SOTIROUDIS, T. G.; EVANGELOPOULOS, A. E. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. **Analytical Biochemistry**, 192 (1991) 112-116.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition), 101 (2010) 659-672.

GILLIES, R.; MOYAL, D.; FORESTIER, S.; KOLLIAS, N. Non-invasive *in vivo* determination of UVA efficacy of sunscreens using diffuse reflectance spectroscopy. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 19 (2003) 190-194.

GOSMARO, F.; BAGNATI, M.; BERTO, S.; BELLOMO, G.; PRENESTI, E. Measurement of total antioxidant capacity of human plasma: Setting and validation of the CUPRAC-BCS method on routine apparatus ADVIA 2400. **Talanta**, 115 (2013) 526-532.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, 571 (2005) 107-120.

HESS, H. H.; DERR, J. E. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. **Analytical Biochemistry**, 63 (1975) 607-613.

HIDRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. Acta Farmacéutica Bonaerense, 23 (2004) 418-424.

HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new *in vitro* method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, 86 (2011) 362-371.

ITAYA, K.; UI, M. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. Clinica Chimica Acta, I4 (1966) 361-366.

KAMEL, R.; MOSTAFA, D. M. Rutin nanostructured lipid cosmeceutical preparation with sun protective potential. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 153 (2015) 59-66.

KARTHIKEYAN, R.; KANIMOZHI, G.; PRASAD, N. R.; AGILAN, B.; GANESAN, M.; MOHANA, S.; SRITHAR, G. 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF-Kb and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblasts cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 161 (2016) 170-176.

KATIYAR, S. K. UV-induced immune suppression and photocarcinogenesis: Chemoprevention by dietary botanical agents. **Cancer Letters**, 255 (2007) 1-11.

KIM, I.; HE, Y. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. **Genes and Diseases**, 1 (2014) 188-198.

KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 13 (2012) 91-110.

KRISTELLER, D. C. G. Identificação e caracterização de subunidades catalíticas e reguladoras de proteínas fosfatases de *Dictyostelim discoideum*. 2007. 151 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KUETE, V.; SANDJO, L. P.; WIENCH, B.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and modes of action of four Cameroonian dietry spices ethno-medically used to treat Cancers: *Echinops giganteus*, *Xylopia aethiopica*, *Imperata cylindrica* and *Piper capense*. Journal of Ethnopharmacology, 149 (2013) 245-253.

LAMORE, S.; WONDRAK, G. T. UVA causes dual inactivation of cathepsin B and L underlying lysosomal dysfuntion in human dermal fibroblastos. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 123 (2013) 1-12. LEBONVALLET, N.; JEANMAIRE, C.; DANOUX, L.; SIBILLE, P.; PAULY, G.; MISERY, L. The evalution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **European Journal of dermatology**, 20 (2010) 671-684.

LI, H.; RAO, A.; HOGAN, P. G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. **Trends Cell Biology**, 21 (2011) 91-103.

LIM, C. W.; KIM, J.; BAEK, W.; KIM, B. S.; LEE, S. C. Functional roles of the protein phosphatase 2C, *AtAIP1*, in abscisic acid signaling and sugar tolerance in Arabidopsis. **Plant Science**, 187 (2012) 83-88.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37 (2001) 293-303.

LIU, Y.; LI, X. Genistein induced apotosis in human gastric carcinoma cells. Advanced Materials Research, 183-185 (2011) 1283-1286.

MAHÉ, E.; BEAUCHET, A.; de MALEISSYE, M.; SAIAG, P. Are sunscreens luxury products? Journal of the American Academy of Dermatology, 65 (2011) e73-e79.

MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. A Review of Health Benefits, Regulations, and Controversies. **Dermatologic Clinics**, 32 (2014) 427-438.

MANZANO, A.; MARTÍN, M. L.; VALERO, F.; ARMENTA, C. A single method to estimate the daily global solar radiation from monthly data. **Atmospheric Research**, 166 (2015) 70-82.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; GEORGETTI, S. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; BRONZATI, V.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity as an additional parameter to attain the functional quality of natural extracts. Latin American Journal of Pharmacy, 27 (2008) 325-332.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; REDONDO, J. M. Inhibitors of the Calcineurin/NFAT Pathway. Current Medicinal Chemistry, 11 (2004) 997-1007.

MARTO, J.; GOUVEIA, L. F.; CHIARI, B. G.; PAIVA, A.; ISAAC, V.; PINTO, P.; SIMÕES, P. The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. **Industrial Crops and Products**, 80 (2016) 93-100.

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

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. Caderno de Farmácia, 18 (2002) 81-87.

MILLINGTON, K. R.; OSMOND, M. J.; McCALL, M. J. Detecting free radicals in sunscreens exposed to UVA radiation using chemiluminescence. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 133 (2014) 27-38.

MORLIÈRE, P.; MOYSAN, A.; SANTUS, R.; HÜPPE, G. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084 (1991) 261-268.

MOYAL, D.; CHARDON, A.; 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**, 16 (2000) 245–249.

MULERO, M.C.; AUBAREDA, A.; ORZÁEZ, M.; MESSEGUER, J.; SERRANO-CANDELAS, E.; MARTÍNEZ-HOYER, S.; MESSEGUER, A.; PÉREZ-PAYÁ, E.; PÉREZ-RIBA, M. Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 284 (2009) 9394-9401.

MUSSON, R. E. A.; HENSBERGEN, P. J.; WESTPHAL, A. H.; TEMMINK, W. P.. M.; DEELDER, A. M.; van PELT, J.; MULLENDERS, L. H. F.; SMIT, N. P. M. UVA-1 radiation inhibits calcineurin through oxidative damage mediated by photosensitization. **Free Radical Biology and Medicine**, 50 (2011) 1392-1399.

MUSSON, R. E. A.; MULLENDERS, L. H. F.; SMIT, N. P. M. Effects of arsenite and UVA-1 radiation on calcineurin signaling. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 735 (2012) 32-38.

MUSSON, R. E. A.; SMIT, N. P. M. Regulatory Mechanisms of Calcineurin Phosphatase Activity. Current Medicinal Chemistry, 18 (2011) 301-315.

NGHIEM, P.; PEARSON, G.; LANGLEY, R. Tacrolimus and pimecrolimus: From clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. Journal of the American Academy of Dermatology, 46 (2002) 228-241.

NORVAL, M.; EL-GHORR, A. A. UV-induced immunosuppression in virus infections. Mutation Research, 422 (1998) 131-138.

OLIVEIRA, D. N.; DELAFIORI, J.; FERREIRA, M. S.; CATHARINO, R. R. *In vitro* evaluation of Sun Protection Factor and stability of commercial sunscreens using mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 988 (2015) 13-19.

OLIVIER, E.; DUTOT, M.; REGAZZETTI, A.; DARGÈRE, D.; AUZELI, N.; LAPRÉVOTE, O.; RAT, P. Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: role of 25-

hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, xxx (2016) xxx-xxx.

PELIZZO, M.; ZATTRA, E.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; GAROLI, D.; ALAIBAC, M. *In Vitro* Evaluation of Sunscreens: An Update for the Clinicians. **ISRN Dermatology**, 2012 (2012) 1-4.

PESCIA, A. C.; ASTOLFI, P.; PUGLIA, C.; BONINA, F.; PERROTTA, R.; HERZOG, B.; DAMIANI, E. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is best? **International Journal of Pharmaceutics**, 427 (2012) 217-223.

POLTE, T.; TYRRELL, R.M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. Free Radical Biology and Medicine, 36 (2004) 1566-1574.

PRESCOTT, T. A. K.; ARIÑO, J.; KITE, G. C.; SIMMONDS, M. S. J. Inhibition of human calcineurin and yeast calcineurin-dependent gene expression by *Jasminum humile* leaf and root extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 140 (2012) 293-297.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N. R.; KARTHIKEYAN, S. Sesamol inhibits UVB-induced ROS generation and subsequente oxidative damage in cultured human skin dermal fibroblastos. Archives of Dermatological Research, 302 (2010) 733-744.

Regulation (EC) n°. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products, 2009.

ROBERTS, B.; POHL, J.; GOOCH, J. L. A fluorimetric method for determination of calcineurin activity. **Cell Calcium**, 43 (2008) 515-519.

ROMANHOLE, R. C.; ATAIDE, J. A.; CEFALI, L. C.; MORIEL, P.; MAZZOLA, P. G. Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiationand/or fluorescent radiation. Journal of Photochemistry and Photobioloby B: Biology, 162 (2016) 45-49.

SABATER-TOBELLA, J.; VILUMARA-TORRALLARDONA, A. Buenas prácticas de laboratorio (GLP). Madrid: Díaz de Santos, 1988.

SAITOH, Y.; MIYANISHI, A.; MIZUNO, H.; KATO, S.; AOSHIMA, H.; KOKUBO, K.; MIWA, N. Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracelular ROS generation and DNA damages. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 102 (2011) 69-76.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. Journal of the American Academy of Dermatology, 64 (2011) 748-458.

SCHALKA, S; dos REIS, V. M. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. Anais Brasileiros de Dermatologia, 86 (2011) 507-515.

SCHWARZ, T.; SCHWARZ, A. Molecular mechanisms of ultraviolet radiationinduced immunosuppression. **European Journal of Cell Biology**, 90 (2011) 560-564.

SELLAR, K. J., van ROSSUN, H. H.; ROMIJN, F. P. H. T. M.; SMIT, N. P. M.; FIJTER, J. W.; van PELT, J. Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. **Analytical Biochemistry**, 358 (2006) 104-110.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, 360 (2007) 794-802.

SHERWOOD, A. R.; PAASCH, B. C.; WORBY, C. A.; GENTRY, M. S. A malachite green-based assay to assess glucan phosphatase activity. **Analytical Biochemistry**, 435 (2013) 54-56.

SINGH, M.; KAPOOR, A.; BHATNAGAR, A. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. **Chemico-Biological Interactions**, 234 (2015) 261-273.

SKLAR, L. R.; ALMUTAWA, F.; LIM, H. W.; HAMZAVI, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. **Photochemical and Photobiological Sciences**, 12 (2013) 54-64.

SMIT, N. P. M.; ROSSUM, H. H. V.; ROMIJN, F. P.; SELLAR, K. J.; BREETVELD, M.; GIBBS, S.; PELT, J. V. Calcineurin activity and inhibition in skin and (Epi) Dermal cell cultures. Journal of Investigative Dermatology, 128 (2008) 1686-1690.

SMIT, N.; MUSSON, R.; ROMIJN, F.; VAN ROSSUM, H.; VAN PELT, J. Effects of Ultraviolet A-1 Radiation on Calcineurin Activity and Cytokine Production in (Skin) Cell Cultures. **Photochemistry and Photobiology**, 86 (2010) 360-366.

SOHN, M.; HERZOG, B.; OSTERWALDER, U.; IMANIDIS, G. Calculation of the sun protection fator of sunscreens with diferente vehicles using measured film thickness distribution – Comparison with the SPF *in vitro*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 159 (2016) 74-81.

SOMMER, D.; FAKATA, K. L.; SWANSON, S. A.; STEMMER, P. M. Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants *in vitro*. European Journal of Biochemistry, 267 (2000) 2312-2322.

STEENVOORDEN, D. P. T.; van HENEGOUWEN, G. M. J. B. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 41 (1997) 1-10.

TANNER, P. R. Sunscreen Product Formulation. Dermatologic Clinics, 24 (2006) 53-62.

TOSATO, M. G.; ORALLO, D. E.; ALI, S. M.; CHURIO, M. S.; MARTIN, A. A.; DICELIO, L. Confocal Raman spectroscopy: *In vivo* biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 153 (2015) 51-58.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30 (2007) 1323-1338.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO,
C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 32 (2011) 27-34.

VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, L.; NAVALÓN, A. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human sérum samplesby dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 121 (2014) 97-104.

VENDITTI, E.; BRUGÈ, F.; ASTOLFI, P.; KOCHEVAR, I.; DAMIANI, E. Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage. **Journal of Dermatological Science**, 63 (2011) 55-61.

VIELHABER, G.; GRETHER-BECK, S.; KOCH, O.; JOHNCOCK, W.; KRUTMANN, J. Sunscreens with an absorption maximum of [greater-than-or-equal] 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. **Photochemical and Photobiological Sciences**, 5 (2006) 275-282.

VILBER LOURMAT. Informações sobre o sistema de irradiação UV, Bio-Spectra-3.2014.Disponívelem:

<http://www.biosystems.com.br/produto/1703/sistemairradiacaouv3modosdeirrad312365nmp testesdesensibilizacao220volts >. Acesso em: 01 fev. 2016. VILELA, F. M. P; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; FONSECA, M. J. V. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 80 (2012) 387-392.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radical Biology and Medicine, 27 (1999) 612-616.

WANG, Y.; YU, H.; ZHANG, Y.; LAI, C.; SHE, Y.; LI, W.; FU, F. Interaction between abscisic acid receptor PYL3 and protein phosphatase type 2C in response to ABA signaling in maize. **Gene**, 549 (2014) 179-185.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1994. Environmental Health Criteria, Nº 160: Ultraviolet Radiation. Geneva: WHO, 1994.

YE, Q.; FENG, Y.; YIN, Y.; FAUCHER, F.; CURRIE, M. A.; RAHMAN, M. N.; JIN, J.; LI, S.; WEI, Q.; JIA, Z. Structural basis of calcineurin activation by calmodulin. **Cellular Signalling**, 25 (2013) 2661-2667.

ZANCHETTA, L. M.; KIRK, D.; LYNG, F.; WALSH, J.; MURPHY, J. E. J. Celldensity-dependent changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species production in human skin cells post sunlight exposure. **Photodermatology**, **Photoimmunology and Photomedicine**, 26 (2010) 311-317.

ZHAO, Y.; YANG, H.; MENG, K.; YU, S. Probing the Ca²⁺/CaM-induced secondary structural and conformational changes in calcineurin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 64 (2014) 453-457.

ZHAO, Y.; ZHANG, J.; SHI, X.; LI, J.; WANG, R.; SONG, R.; WEI, Q.; CAI, H.; LUO, J. Quercetin targets the interaction of calcineurin with LxVP-type motifs in immunosuppression. **Biochimie**, 127 (2016) 50-58.

ZHU, S.; GAN, Z.; LI, Z.; LIU, Y.; YANG, X.; DENG, P.; XIE, Y.; YU, M.; LIAO, H.; ZHAO, Y.; ZHAO, L.; LIAO, F. The measurement of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 activities via the quantification of inorganic phosphate with malachite green. **Analytica Chimica Acta**, 636 (2009) 105-110.