UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível

Juliana Vescovi de Freitas

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível

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

Orientado(a): Juliana Vescovi de Freitas

Orientador(a): Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Ribeirão Preto
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Freitas, Juliana Vescovi

Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível. Ribeirão Preto, 2016.

104p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar.

1. Antioxidantes. 2. *In vitro*. 3. Radiação UVA. 4. Luz visível.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Juliana Vescovi de Freitas
Título do trabalho: Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível

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.

Orientador(a): Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

A **Deus**, pelo sustento espiritual e alimento da alma, pelo dom da vida, pela família, pela paz e tranquilidade nos momentos atribulados, pelas bênçãos e graças concedidas durante esse período e por iluminar sempre os meus caminhos.

Aos meus amados pais, **Leoncio** e **Nilza**, pelo incansável apoio e incentivo para realização dos meus sonhos, pelo imensurável amor, carinho, dedicação e compreensão, e pelos exemplos de vida, de cristianismo e profissionalismo.

À minha amada irmã **Caroline**, pelo apoio e incentivo constantes, pelo carinho, amizade, amor e compreensão.

A todos os meus **familiares** e **amigos** pelo apoio, incentivo, carinho, companheirismo e pela forte presença em minha vida.

A **todas as pessoas**, que foram fundamentais nesta caminhada, pois apenas meu esforço e dedicação não seriam suficientes para concretizar esse sonho.

Agradecimento especial

À minha orientadora, Profa. Dra. **Lorena Rigo Gaspar Cordeiro**, pelos ensinamentos, confiança, entusiasmo, orientação e incentivo constantes, pelo exemplo de determinação e profissionalismo, por sua amizade e apoio em todas as horas e, principalmente, por ter me proporcionado experiências incríveis durante o Mestrado e o Doutorado.

Agradecimentos

Às eternas amigas do laboratório Tecnologia de Cosméticos (Tecnoprot), **Carolina, Larissa, Camila, Renata, Karina, Marcela, Gabriela, María Tereza e Karen,** pelo apoio, amizade, colaboração e pelo período de convivência que tivemos juntas.

Aos amigos do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) **Tayana, Laryssa, Rebeca, Divino, Mariana, Paulo, Helena, Felipe, Isabel, Marina, Carolina, Melani, Aline, Décio,** em especial à técnica **Alessandra**, por me receberem de forma tão acolhedora, pela ótima convivência e pela solicitude em vários momentos.

Ao professor Dr. **Mauricio da Silva Baptista,** por ter aceitado tão prontamente me receber em seu laboratório para realização de estudos em colaboração, pela generosidade, pelas orientações e importantes contribuições para o trabalho.

À professora Dra. **Waleska Kerllen Martins Gardesani** pelo carinho, amizade, acolhida, pela importante ajuda nos experimentos, em especial pelas orientações e excelentes contribuições para o trabalho.

Ao professor Dr. **Luciano Bachmann,** pela realização das medidas de intensidade de luz visível.

À professora Dra. **Renata Fonseca Vianna Lopez,** por ter gentilmente cedido a linhagem celular B16F10 e pela concessão do uso de equipamentos para realização de experimentos.

Ao professor Dr. **Marcelo Dias Baruffi**, por ter gentilmente cedido a linhagem celular Melan-a.

Aos professores Dra. **Lucia Helena Faccioli** e Dr. **Roberto Santana da Silva,** pela concessão do uso de equipamentos para realização de experimentos.

A todos os **Professores** que, em algum momento, gentilmente cederam algum material ou equipamento para a realização deste trabalho, e que contribuíram com alguma sugestão para a pesquisa.

Aos professores Dr. **Jairo Kenupp Bastos,** Dra. **Marilisa Guimarães Lara** e Dr. **Luis Alexandre Pedro de Freitas,** pelas correções e sugestões feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

À pós-graduanda **Larissa Bueno,** pelas orientações e solicitude em vários momentos.

Aos técnicos **Patrícia,** pela ajuda e solicitude**, Cris, Tomas, Juliana, Júnior**, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana dos Santos Florêncio,** por toda assistência prestada durante a realização deste trabalho.

A todos os **Professores** da Universidade de São Paulo que contribuíram para minha formação.

A todos os **funcionários** da Universidade de São Paulo que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A **todos** que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pelo apoio financeiro.

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria, daquele que adquiriu a inteligência, porque mais vale este lucro que o da prata, e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro. Ela é mais preciosa que as pérolas, jóia alguma a pode igualar.”

Pr 3,13-15

RESUMO

FREITAS, J. V. **Avaliação *in vitro* do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz visível.** 2016. 104f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Tendo em vista que a radiação ultravioleta A (UVA) e a luz visível (VIS) apresentam alto potencial para gerar oxigênio singleto ($^1O_2$) e provocar estresse oxidativo, é importante buscar substâncias capazes de prevenir ou minimizar o impacto desse evento sobre a pele, já que atualmente, há poucos filtros solares orgânicos no mercado que oferecem ampla proteção contra a UVA I e não há filtros orgânicos que ofereçam proteção contra a luz VIS. Estudos da literatura indicam que alguns antioxidantes, tais como a apigenina (API), a crisina (CRI) e o beta-caroteno (BTC), podem neutralizar o $^1O_2$ e apresentam potencial de uso na fotoproteção. Deste modo, o objetivo do presente projeto foi avaliar a segurança da API, da CRI e do BTC, por meio dos ensaios de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade, e também sua eficácia, através de ensaios para determinar a proteção contra a morte celular induzida pela fotossensibilização da melanina, que gera $^1O_2$, e a proteção de membrana contra danos fotooxidativos. Inicialmente, foi avaliada a fotoestabilidade da API, da CRI e do BTC quando submetidos à radiação UVA e luz VIS, por meio de CLAE. A fototoxicidade das substâncias em estudo frente à radiação UVA e luz VIS, empregando-se cultura de fibroblastos (Balb 3T3 clone A31), de melanócitos (Melan-a) e de melanoma (B16F10) também foi realizada. Para avaliar a eficácia, o efeito da API, da CRI e do BTC sobre a viabilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina e após indução da melanogênese, bem como seu efeito sobre a proteção de membrana em modelo mimético de lipossomas, foram avaliados frente à luz VIS. Os resultados do estudo de fotoestabilidade mostraram que os antioxidantes, isolados ou em associação, foram considerados fotoestáveis em ambas as faixas de radiação avaliadas (UVA/VIS e VIS). No estudo de fotorreatividade, a API, a CRI e a associação (API+CRI+BTC) se mostraram fracamente fotorreativas após exposição ao UVA/VIS. No entanto, na presença de VIS, nenhum dos compostos apresentou fotorreatividade. No estudo de fototoxicidade, foi observado potencial fototóxico após irradiação por UVA/VIS para a CRI, BTC e a associação (API+CRI+BTC) nas três linhagens celulares avaliadas. Já a API, não apresentou potencial fototóxico apenas no ensaio realizado com fibroblastos. Na faixa da luz VIS, o BTC apresentou potencial fototóxico nas três linhagens celulares avaliadas; entretanto, para os demais antioxidantes (API e CRI) e sua associação (API+CRI+BTC) houve variação na resposta entre as diferentes linhagens. Os resultados dos estudos para avaliação da eficácia mostraram que os antioxidantes foram capazes de proteger as células contra morte induzida pela fotossensibilização da melanina, sendo que o efeito da API foi superior ao da CRI e do BTC. No estudo de proteção de membrana apenas a API foi capaz de conferir proteção contra os danos fotooxidativos induzidos pela luz VIS. A investigação do potencial de uso da API, da CRI e do BTC na proteção contra a radiação UVA e luz VIS mostrou que o uso de tais antioxidantes e da sua combinação visando a fotoproteção da pele é mais seguro na faixa da luz VIS. Além disso, concluiu-se que API é o mais promissor entre os antioxidantes estudados em relação à segurança e à eficácia, e apresenta elevado potencial de uso na proteção contra a luz VIS.

Palavras-chave: 1. Antioxidantes. 2. Proteção *in vitro*. 3. Radiação UVA. 4. Luz visível.

ABSTRACT

FREITAS, J. V. ***In vitro* evaluation of the potential use of apigenin, chrysin and beta-carotene in protection against UVA radiation and visible light.** 2016. 104f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Considering that ultraviolet A (UVA) radiation and visible light (VIS) present high potential to generate singlet oxygen ($^1O_2$) and cause oxidative stress, it is important to search for substances that are able to prevent or minimize the impact of such event on the skin, since currently, there are few organic UV-filters on the market that offer broad protection against UVA I and there is no organic UV-filter which provide VIS light protection. Previous studies showed that some antioxidants, such as apigenin (API), chrysin (CRI) and beta-carotene (BTC) can neutralize $^1O_2$ and exhibit potential for use in photoprotection. Therefore, the aim of this study was to evaluate the safety of API, CRI and BTC, by performing photostability, photoreactivity and phototoxicity assays, and also its efficacy, through the determination of the protection against cell death induced by melanin photosensitization, which generates $^1O_2$, and also the assessment of membrane protection against photooxidative damage. Firstly, API, CRI and BTC photostability was evaluated after exposure to UVA and VIS light by using HPLC. The phototoxicity of the antioxidants subjected to UVA and VIS light, using cultured fibroblasts (Balb 3T3 clone A31), melanocytes (melan-a) and melanoma (B16F10) was also performed. In order to assess efficacy, API, CRI and BTC effect on the viability of B16F10 cells with melanin basal levels and after melanogenesis induction as well as their effect on membrane protection using mimetic liposome model were evaluated after VIS light exposure. Results of photostability studies showed that the antioxidants, isolated or combined, were considered photostable in both ranges (UVA/VIS and VIS). In the photoreactivity study API, CRI and the combination (API + CRI + BTC) were considered weakly photoreactive after UVA/VIS exposure. However, in the presence of VIS light, none of the compounds exhibited photoreactivity. In the phototoxicity study, phototoxic potential was observed for CRI, BTC and the combination (API + CRI + BTC) after UV/VIS irradiation in the three studied cell lines. API showed no phototoxic potential only in the assay performed with fibroblasts. In the VIS range, BTC showed phototoxic potential in the three cell lines; however, for the other antioxidants (API and CRI) and their combination (API + CRI + BTC) there was variance in response among different cell lines. Efficacy studies showed that the studied antioxidants were able to protect cells from death induced by melanin photosensitization, and API effect was superior to that of CRI and BTC. In membrane protection study, only API provided protection against VIS photooxidative induced damage. The investigation of the potential use of API, CRI and BTC for protection against UVA and VIS light showed that the use of such antioxidants and their combination aiming skin photoprotection is safer in the VIS range. Furthermore, it was concluded that API is the most promising antioxidant regarding safety and efficacy and presents high potential for use in protection against VIS light.

Keywords: 1. Antioxidants. 2. *In vitro* protection. 3. UVA radiation. 4. Visible Light.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das camadas da pele **A)** e da epiderme **B)**..... 9

Figura 2 – Representação da profundidade de penetração da radiação solar nas das camadas da pele 11

Figura 3 – Imagem de melanócitos primários em cultura obtida em microscópio invertido no aumento de 200x 13

Figura 4 – Estrutura molecular dos monômeros que constituem a **A)** eumelanina e **B)** feomelanina 14

Figura 5 – Estrutura molecular da apigenina 18

Figura 6 – Estrutura molecular da crisina 19

Figura 7 – Estrutura molecular do beta-caroteno 20

Figura 8 – Espectro de absorção da apigenina, crisina e beta-caroteno (16 $\mu g.mL^{-1}$) em solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70)..... 21

Figura 9 – Fonte de irradiação utilizada na triagem para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS: **A)** Sistema de irradiação composto por uma lâmpada de arco de mercúrio; **B)** Espectro de emissão do sistema de irradiação 36

Figura 10 – Fonte de irradiação utilizada nos estudos de proteção contra os danos fotoinduzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10: **A)** Sistema de irradiação composto por um arranjo de quatro lâmpadas fluorescentes tubulares OSRAM DULUX L 55W/840; **B)** Espectro de emissão do sistema de irradiação obtido com um espectrofotômetro Ocean Optics (USB 2000+UV-VIS-ES) guiado por fibra ótica Ocean Optics (QP50-2-UV-VIS) – picos em 366, 305, 436, 490, 546, 585 e 612 nm 41

Figura 11 – Perfil cromatográfico dos padrões (2.5 $\mu g.mL^{-1}$) em tetrahidrofurano: isopropanol (30:70). Picos: apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas: eluição por gradiente com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol; fluxo: 0,8 $mL.min^{-1}$; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 nm (API, CRI) e 454nm (BTC)..... 49

Figura 12 – Recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC), isolados e em combinação (CMB = API+CRI+BTC) após exposição à UVA (275 KJ/m^2) / VIS (1080KJ/m^2) ou VIS (1080 KJ/m^2). ANOVA, Média ± E.P.M..... 53

Figura 13 – Viabilidade celular em diferentes doses de radiação UVA/VIS (9/40, 15/70, 20/90, 25/110 e 30/130 J/cm^2) das linhagens: A) Balb/3T3 clone A31; B) Melan-a; C) B16F10 56

Figura 14 – Viabilidade celular em diferentes doses de luz VIS (40, 70, 90, 110 e 130 J/cm^2) das linhagens: A) Balb/3T3 clone A31; B) Melan-a; C) B16F10 56

Figura 15 – Curva dose resposta dos antioxidantes isolados e em combinação (apigenina+crisina+beta-caroteno) obtidas através do Software Phototox 2.0 em cultura de fibroblastos Balb/3T3 clone A31 **(A, D, G e J)**, melanócitos Melan-a **(B, E, H e K)** e melanoma B16F10 **(C, F, I e L)** na ausência e presença de UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2). Os pontos azuis e amarelos referem-se, respectivamente às células não irradiadas (-UVA/VIS) e irradiadas (+UVA/VIS) 59

Figura 16 – Curva dose resposta dos antioxidantes isolados e em combinação (apigenina+crisina+beta-caroteno) obtidas através do Software Phototox 2.0 em cultura de fibroblastos Balb/3T3 clone A31 **(A, D, G e J)**, melanócitos Melan-a **(B, E, H e K)** e melanoma B16F10 **(C, F, I e L)** na ausência e presença de VIS (40 J/cm^2). Os pontos azuis e amarelos referem-se, respectivamente às células não irradiadas (-VIS) e irradiadas (+VIS) 60

Figura 17 – Conteúdo de melanina obtido após indução da melanogênese das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++). ANOVA, Média ± E.P.M., $p < 0,001$. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl 62

Figura 18 – Viabilidade das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++). A viabilidade celular foi medida após irradiação com 12 J/cm^2 de luz VIS. ANOVA, Média ± E.P.M, $p < 0,0001$. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl 62

Figura 19 – Correlação entre a quantidade arbitrária de melanina (vide Figura 17) e a viabilidade das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++) em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl, após irradiação com 12 J/cm^2 de luz VIS 63

Figura 20 – Viabilidade das células B16F10, tratadas com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas, após irradiação com diferentes doses de luz VIS (12, 24 e 36 J/cm^2) 64

Figura 21 – Geração de oxigênio singleto ($^1O_2$) a partir da melanina extraída das células B16F10, tratadas com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas, após excitação com luz VIS em 450 nm, em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl: **A)** Espectro de emissão de $^1O_2$ na faixa de 1200 a 1340 nm; **B)** Intensidade de emissão de $^1O_2$ em 1275 nm 64

Figura 22 – Viabilidade das células B16F10 com nível basal de melanina (-) e que receberam tratamento para indução de melanogênese com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina (+), após irradiação com 36 J/cm^2 de luz VIS na ausência (C0) e na presença de diferentes concentrações (C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7 equivalentes a, respectivamente, 6,8, 10, 14,7, 21,5, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL-1) de apigenina, crisina e beta-caroteno: **A)** As linhas representam a Média ± E.P.M.; **B)** As barras verticais representam a Média ± E.P.M., ANOVA, os símbolos representam diferença estatística em relação ao controle com nível basal de melanina (*: $p < 0,0001$) e que receberam tratamento para indução da melanogênese (•: $p < 0,05$)..... 66

Figura 23 – Danos fotoinduzidos e proteção, em função porcentagem de liberação de carboxifluoresceína (CF), utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador: **A)** Danos nos LP após fotoativação do DMMB por luz VIS (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) e **B)** efeito do ácido gálico (AG) 30 µM (controle positivo). Os resultados correspondem à Média ± E.P.M 68

Figura 24 – Efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno em diferentes concentrações (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, equivalentes a, respectivamente, 6,8, 10, 14,7, 21,5, 31,6, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL-1) na liberação de carboxifluoresceína (CF) em função do tempo de irradiação (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador. O controle do experimento corresponde ao LP. Os resultados correspondem à Média ± E.P.M 69

Figura 25 – Efeito do ácido gálico 30 µM (controle positivo) e da apigenina, crisina e beta-caroteno (6,8 µg.mL^{-1}) na porcentagem de carboxifluoresceína (CF) liberada em função do tempo de irradiação (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador. Os resultados correspondem à Média ± E.P.M 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela 1 – Linearidade de apigenina, crisina e beta-caroteno em solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) 50

Tabela 2 – Precisão e exatidão intra- e inter-ensaio da apigenina, crisina e beta-caroteno em tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) 51

Tabela 3 – Porcentagem de recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) isolados ou em combinação (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (275 KJ/m^2) / VIS (1080 KJ/m^2) 52

Tabela 4 – Porcentagem de recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) isolados ou em combinação (API+CRI+BTC) após exposição à luz VIS (1080 KJ/m^2) 53

Tabela 5 – Geração de oxigênio singleto ($^1O_2$, SO) e ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$, SA) a partir da apigenina (API), da crisina (CRI), do beta-caroteno (BTC) e da sua combinação (CMB = API+CRI+BTC) após exposição à UVA (57 J/cm^2) / VIS (245 J/cm^2) ou VIS (245 J/cm^2) 55

Tabela 6 – Potencial fototóxico da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2) ou VIS (40 J/cm^2) em diferentes linhagens celulares 57

Tabela 7 – Fototoxicidade da apigenina (API), crisina (CRI), beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2) 57

Tabela 8 – Fototoxicidade da apigenina (API), crisina (CRI), beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à luz VIS (40 J/cm^2) 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
µM	Micromolar
3T3 NRU-PT	3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Apigenina
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Soroalbumina bovina
BTC	Beta-caroteno
CF	Carboxifluoresceína
CLAE	Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência
cm	Centímetros
CMB	Combinação de apigenina, crisina e beta-caroteno
CRI	Crisina
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMMB	Dimetil azul de metileno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPM	Erro Padrão Médio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERSS	Espécies reativas de enxofre
h	Horas
Hz	Hertz
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
J	Joules
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

KJ	Quilojoules
LD	Limite de Detecção
LED	Diodo emissor de luz
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LP	Lipossomas
M	Molar
m	Metros
min	Minutos
mJ	Milijoules
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MPE	Foto efeito médio
ms	Milissegundos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
mW	Miliwatts
NBT	Tetrazólio nitroazul
nM	Nanomolar
nm	Nanômetros
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PIF	Fator de fotoirritação
r	Coeficiente de correlação
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Bovino Fetal
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VIS	Visível
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
™	Trademark
°C	Graus Célcius
Cu^{+}	Íon cuproso
CO_2	Dióxido de carbono
Fe^{3+}	Íon férrico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
O_2	Oxigênio molecular
$^1O_2$	Oxigênio singleto
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxil
$O_2^{-\bullet}$	Radical superóxido
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxil
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxil
NaCl	Cloreto de sódio
NaPB	Tampão fosfato de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vii
LISTA DE SÍMBOLOS ix

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA 7
2.1 A pele e a radiação solar 8
2.2 Melanócitos e melanina 12
2.3 Antioxidantes no contexto da fotoproteção 15
2.4 Avaliação de segurança e eficácia 20
2.4.1 Fotoestabilidade 22
2.4.2 Fotorreatividade 23
2.4.3 Fototoxicidade 24
2.4.4 FPS e FPUVA 25
2.4.5 Determinação da ação antioxidante 26

3 OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo geral 29
3.2 Objetivos específicos 29

4 MATERIAIS E MÉTODOS 30
4.1 Materiais 31
4.1.1 Materiais e Reagentes 31
4.1.2 Equipamentos e acessórios 32
4.1.3 Linhagens celulares 34
4.2 Métodos 34
4.2.1 Estudo para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS 34

4.2.1.1 Desenvolvimento de validação do método de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) 34
4.2.1.2 Fonte de irradiação 36
4.2.1.3 Estudo de fotoestabilidade 37
4.2.1.4 Estudo de fotorreatividade 37
4.2.1.4.1 Preparação das substâncias teste 37
4.2.1.4.2 Procedimento para detecção de oxigênio singleto e ânion superóxido 38
4.2.1.5 Estudo de fototoxicidade em cultura de fibroblastos (3T3 NRU), de melanócitos (Melan-a) e de melanoma (B16F10) em monocamadas 38
4.2.2 Avaliação da eficácia da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção contra os danos induzidos pela luz VIS 40
4.2.2.1 Estudo de proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10 41
4.2.2.1.1 Fonte de irradiação 41
4.2.2.1.2 Quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese 42
4.2.2.1.3 Determinação da viabilidade celular em diferentes condições de indução de melanogênese 43
4.2.2.1.4 Determinação da dose de luz VIS 43
4.2.2.1.5 Quantificação da geração de oxigênio singleto 44
4.2.2.1.6 Determinação da viabilidade celular para avaliar o efeito protetor da apigenina, da crisina e do beta-caroteno frente à luz VIS 45
4.2.2.2 Estudo do efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas a partir da lecitina de soja 46

5 RESULTADOS 48
5.1 Estudo para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS 49
5.1.1 Desenvolvimento de validação do método de Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) 49
5.1.2 Estudo de fotoestabilidade 52
5.1.3 Estudo de fotorreatividade 55
5.1.4 Estudo de fototoxicidade 56
5.2 Avaliação da eficácia da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra os danos induzidos pela luz VIS 61
5.2.1 Estudo de proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10 61

5.2.1.1 Quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese 61

5.2.1.2 Determinação da viabilidade celular em diferentes condições de indução de melanogênese 62

5.2.1.3 Determinação da dose de luz VIS 63

5.2.1.4 Quantificação da geração de oxigênio singleto 64

5.2.1.5 Determinação da viabilidade celular para avaliar o efeito protetor da apigenina, crisina e beta-caroteno 65

5.2.2 Estudo do efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas a partir da lecitina de soja 67

6 DISCUSSÃO 71

7 CONCLUSÕES 84

7.1 Conclusão geral 85

7.2 Conclusões específicas 85

8 REFERÊNCIAS 87

1 Introdução

A radiação solar compreende os espectros do infravermelho, do ultravioleta (UV) e da luz visível (VIS). Sendo que cerca de 56%, 39% e 5% da radiação solar correspondem, respectivamente, aos raios infravermelhos (800nm-1mm), à luz VIS (400-760 nm), e à radiação UV (280-400nm) (GONZÁLEZ et al., 2008; ROMANHOLE et al., 2015).

Os danos fotoinduzidos pela radiação UV se iniciam após absorção da radiação por cromóforos endógenos, tais como o DNA, a melanina, o ácido urocânico, e aminoácidos aromáticos (ROMANHOLE et al., 2015). Esses danos podem ocorrer por meio da reação direta entre os cromóforos excitados e o DNA (reação tipo I), ou por transferência de energia para o oxigênio molecular (reação tipo II), o que leva à formação de radicais superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e de oxigênio singleto ($^1O_2$) (UMLAS et al., 1985; MORI et al., 1988). O $^1O_2$ é uma molécula altamente eletrofílica capaz de reagir com duplas ligações de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (MICHAELI; FEITELSON, 1994).

Os raios UVA são capazes de penetrar profundamente a derme, sendo que a exposição a esses raios induz à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o $^1O_2$ por meio da fotossensibilização de cromóforos endógenos (TYRREL, 1994), o que pode causar danos às macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (NICHOLS; KATIYAR, 2010). A UVA possui potencial genotóxico, ou seja, é capaz de produzir mutações em células humanas normais e, por isso, pode induzir à carcinogênese. Além disso, a radiação UVA está relacionada ao fotoenvelhecimento e à diminuição da hidratação e elasticidade da pele (LAVKER et al., 1995).

A luz VIS, assim como a radiação UV, pode ser absorvida por cromóforos, tais como a protoporfirina, a bilirrubina, a hemoglobina e a melanina, que iniciam reações químicas que podem provocar danos às células (MAHMOUD et al., 2008). O espectro de absorção da melanina abrange comprimentos de onda entre 200 e 900 nm (ZONIOS et al., 2008) e, por isso, possibilita a proteção da pele contra os danos fotoinduzidos pela radiação solar e luz VIS. Por outro lado, a melanina também pode apresentar propriedades tóxicas e atuar como pró-oxidante na presença da luz, uma vez que essa molécula pode sofrer fotossensibilização e gerar EROS, em especial o $^1O_2$ (SUZUKAWA et al., 2012).

A incidência de radiação UV e luz VIS sobre a melanina pode levar à formação de $^1O_2$ ou $O_2^{-\bullet}$ devido à fotossensibilização (CHIARELLI-NETO et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2004; TOFFOLETTI et al., 2009). Apesar de melanina poder atuar como antioxidante sequestrando essas espécies reativas, essa ação pode ser suprimida (TAKEUCHI et al., 2004). Dessa forma, a melanina pode ter efeitos opostos no organismo, ou seja, pode desencadear mecanismos de proteção e também de danos à pele quando exposta à radiação solar.

Durante muito tempo pouca importância foi dada ao potencial da luz VIS em causar efeitos biológicos sobre a pele. No entanto, estudos *in vivo* têm mostrado que a luz VIS é capaz de causar danos cutâneos, tais como eritema (PARRISH et al., 1982), pigmentação (KOLLIAS; BAQER, 1984; MAHMOUD et al., 2010) e, sobretudo, estresse oxidativo devido à geração de EROS (LIEBEL et al., 2012).

Baptista et al. (2012) observaram em estudo *in vitro* que a luz VIS pode induzir à fototoxicidade em macrófagos, queratinócitos e melanócitos, e que esse processo é dependente do tipo e da quantidade de melanina intracelular. Além disso, também foi observado que nas células com grande quantidade de melanina houve aumento de 30 % da produção de $^1O_2$ comparado com as células controle.

Os efeitos da luz VIS sobre a pele humana também foram estudados por Zastrow et al. (2009) que, em estudo *ex vivo*, mostraram que ocorre excesso de produção de radicais livres na pele irradiada pela luz VIS. Altos níveis de radicais livres após exposição à luz VIS também foram observados em modelos clínicos (LIEBEL et al., 2012). Além disso, os resultados dos estudos *in vitro* mostraram que a luz VIS induziu à expressão de metaloproteinase (MMP)-I e à produção de EROS e citocinas pró-inflamatórias (LIEBEL et al., 2012). Esses resultados sugerem que a luz VIS também pode contribuir para o fotoenvelhecimento prematuro da pele.

Atualmente, há na literatura uma grande carência de estudos que envolvam a luz VIS, sendo que a maioria dos estudos sobre os efeitos biológicos e também químicos da radiação solar são voltados para a radiação UV.

O conhecimento sobre os diversos efeitos deletérios que os raios UV e a luz VIS podem provocar na pele, bem como a crescente incidência de casos de câncer de pele na população mundial, tem gerado preocupação em relação à proteção contra a radiação solar (JOU et al., 2012). Por muito tempo, o delineamento de protetores solares restringiu-se a obter formulações que conferissem proteção UVA e UVB. É fato conhecido que no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras é importante utilizar combinações de filtros solares que proporcionem proteção adequada na faixa da UVA e da UVB (JOU et al., 2012). Entretanto, os avanços das pesquisas na área de fotoproteção (LIEBEL et al., 2012; VANDERSEE et al., 2015) mostraram a necessidade de estender o espectro de proteção para a faixa da luz VIS (400-760 nm). Atualmente, não há no mercado filtros solares orgânicos que apresentem proteção nessa faixa de radiação. Assim, o uso de antioxidantes nas formulações fotoprotetoras torna-se a melhor alternativa para conseguir a referida proteção, uma vez que os danos provocados à pele pela luz VIS são causados principalmente por EROS.

Diversos antioxidantes naturais têm sido empregados em protetores solares devido às suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, tais como vitaminas, flavonoides e carotenoides (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; GONZÁLEZ et al., 2008, 2010). Estudos da literatura indicam que alguns antioxidantes, tais como a apigenina, a crisina e o beta-caroteno podem neutralizar o $^1O_2$ (BOHM et al., 1993; NAGAI et al., 2005). Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar $^1O_2$ e provocar estresse oxidativo, a apigenina, a crisina e beta-caroteno se tornam antioxidantes em potencial para prevenir ou minimizar o impacto desses eventos sobre a pele.

A apigenina é um flavonoide pertencente à classe das flavonas, encontrada em plantas e frutas (MCKAY; BLUMBERG, 2006). A apigenina apresenta atividade antioxidante (BEGUM et al., 2012), anti-inflamatória (JEONG et al., 2009) e anti-câncer (SILVAN et al., 2011). Ye et al. (2010) também sugerem que essa flavona exerce potente atividade melanogênica, já que provocou aumento da expressão de três enzimas envolvidas na síntese de melanina.

De acordo com Das et al. (2013) a apigenina foi capaz de proteger queratinócitos humanos e a pele de camundongos contra os efeitos deletérios da radiação UVB, uma vez que proporcionou proteção do DNA através da redução da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano, da inibição da geração de EROS, e da redução da expressão do fator nuclear kappa-B e da proteína quinase ativada por mitógeno p38.

A crisina é uma flavona presente em extratos de plantas, própolis e mel (PICHICHERO et al., 2010). Assim como outros flavonoides, a crisina apresenta atividades biológicas, tais como ações anti-inflamatória (CHO et al., 2004), anti-câncer (KHAN et al., 2011; PICHICHERO et al., 2010) e antioxidante (BORS et al., 1997). Além disso, os resultados do estudo de KIM et al. (2011) sugerem que a crisina pode ser usada como inibidor da hiperpigmentação, uma vez que foi capaz de inibir a melanogênese *in vitro*.

O potencial de uso da crisina na fotoproteção da pele foi sugerido por Wu et al. (2011) após verificarem que a mesma pode atenuar a apoptose, a produção de EROS e a expressão da ciclooxigenase-2 induzidas pela radiação UV; além disso, observou-se que a crisina foi capaz de reverter a redução da expressão de aquaporina-3 induzida pela UVB, tal proteção é considerada importante, uma vez que os canais de aquaporina-3 regulam o transporte de água e glicerol da derme para epiderme e assim melhoram a hidratação do estrato córneo (WU et al., 2011).

Adicionalmente, a apigenina e a crisina mostraram-se efetivas no seqüestro de espécies reativas e na inibição da MMP-1, a qual regula o processo de fotoenvelhecimento da

pele induzido por espécies reativas geradas pela exposição à UVA (SIM et al., 2007). Os resultados desse estudo sugerem que esses flavonoides podem ser úteis na prevenção do fotoenvelhecimento.

O beta-caroteno é o mais abundante e eficiente precursor da vitamina A, e apresenta elevada ação antioxidante (DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998), devida principalmente à sua habilidade em suprimir o $^1O_2$ (BOHM et al., 1993), e também atividades anti-câncer (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007) e antiinflamatória (BAI et al., 2005; OBERMULLER-JEVIC et al., 2001).

A ação antioxidante do beta-caroteno está baseada na sua capacidade de atuar como *quencher* do $^1O_2$ e de substâncias no estado tripleto, dissipando a energia do estado excitado (MORTENSEN, 2001; NIELSEN et al., 1998). A estrutura molecular do beta-caroteno, caracterizada pela presença de numerosas duplas ligações conjugadas, é responsável por sua excelente habilidade em atuar como *quencher* do singleto sem sofrer degradação, e também por sua reatividade química frente a radicais livres (BRITTON, 1995; KRINSKY, 1994). Outro mecanismo pelo qual o beta-caroteno atua como antioxidante consiste na inibição da oxidação provocada por radicais peroxil ($ROO^{\bullet}$) (YANISHLIEVA et al., 1998) e $O_2^{-\bullet}$ (CONN et al., 1992) por meio da transferência de elétrons para essas espécies reativas.

Diversos estudos relataram a proteção oferecida pelo beta-caroteno contra a radiação UV e também infravermelha (BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998). No estudo realizado por Darvin et al. (2011), a aplicação tópica de uma formulação contendo beta-caroteno conferiu proteção à pele humana contra a ação de radicais livres, formados em consequência da exposição à radiação infravermelha. Outros estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação tópica de beta-caroteno conferiu proteção contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA (EVELSON et al., 1997; YASUI; SAKURAI, 2000).

O uso de moléculas antioxidantes eficazes e seguras é fundamental para o desenvolvimento de fotoprotetores visando uma proteção de amplo espectro, ou seja, na faixa da UVA/UVB e da luz VIS. Além da atividade antioxidante, a apigenina e a crisina absorvem radiação UV e o beta-caroteno absorve na região do UV e VIS. Após a excitação pela luz, compostos fotoinstáveis podem facilmente passar por reações fotoquímicas, que podem ocorrer tanto no estado excitado singleto quanto no estado excitado tripleto, que levam à geração de radicais livres e fotoprodutos (EPE, 2012; SHAATH, 2010). A produção de EROS, tais como o $^1O_2$ e o $O^{2-\bullet}$, pode estar envolvida em respostas fototóxicas, incluindo a fotoirritação, a fotogenotoxicidade e a fotoalergia (ONOUE; TSUDA, 2006).

Dessa forma, estudos envolvendo a avaliação de características importantes para eficácia e segurança como, por exemplo, a fotoestabilidade, a fotorreatividade, a fototoxicidade, a proteção contra a geração de $^1O_2$ e a proteção de membrana, são fundamentais para direcionar a busca de novas substâncias fotoprotetoras. Além disso, uma vez que alguns estudos indicam que a luz VIS também gera radicais livres e causa danos à pele, há uma busca por novas moléculas que apresentem proteção nessa faixa da radiação solar.

Atualmente, há uma forte tendência na Europa e também no Brasil em banir o uso de animais de experimentação para avaliação da eficácia e segurança de matérias-primas e produtos cosméticos. Entre os métodos *in vitro* utilizados na avaliação da segurança na presença da luz estão os propostos pelo guia *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10* (ICH, 2013), incluindo a determinação do Coeficiente de Extinção Molar dentro da faixa da luz solar (290-700 nm), da fotorreatividade e da fototoxicidade. Além disso, o estudo de fotoestabilidade também pode contribuir para avaliação da segurança (ICH, 2013). Com relação à eficácia *in vitro* de matérias-primas, diversas metodologias podem ser empregadas para tal avaliação dependendo do tipo de efeito ou característica que se pretende avaliar.

Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar $^1O_2$ e provocar estresse oxidativo, a apigenina, a crisina e o beta-caroteno se tornam potenciais alvos para investigação quanto a viabilidade de uso em fotoprotetores visando proteção UVA e VIS. Assim, a investigação do potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra radiação UVA e luz VIS requer uma avaliação prévia da sua segurança e eficácia. Nesse contexto, o presente estudo é de grande importância, uma vez que propôs a avaliação da segurança, por meio dos ensaios de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade de moléculas antioxidantes com potencial para protegerem a pele e contra os danos induzidos pela radiação UVA e luz VIS. Além disso, propõe a avaliação da eficácia por meio de ensaios para determinar a proteção contra a morte celular induzida pela fotossensibilização da melanina e a proteção de membrana contra os danos fotooxidativos após exposição à luz VIS. Finalizando, em consonância com a legislação atual sobre o uso de animais em pesquisa, optou-se por empregar apenas metodologias alternativas à experimentação animal para avaliar a performance dos antioxidantes com relação à eficácia e segurança.

2 Revisão de Literatura

2.1 A pele e a radiação solar

A pele é o órgão que reveste e delimita o organismo, e é responsável por diversas funções relacionadas à sua homeostase, incluindo o controle da temperatura corporal, a síntese de vitamina D, proteções física, química e imunológica e também proteção contra a radiação UV (CHUONG et al., 2002). A pele é constituída por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Fig. 1A).

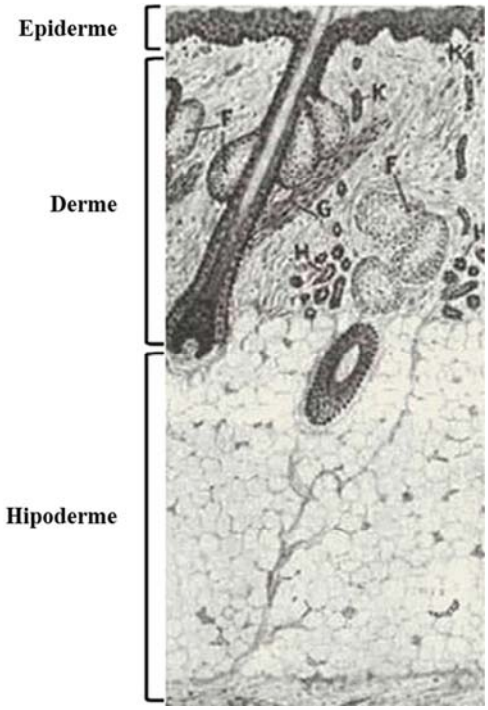
A epiderme pode ser subdivida em estrato córneo, o qual é composto por corneócitos e representa a principal barreira à penetração de fármacos na pele, e epiderme viável que, além de queratinócitos, é constituída por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme viável, por sua vez, é subdivida em camada granulosa, espinhosa e basal (Fig. 1B) (CHUONG et al., 2002; MENON, 2002).

A camada granulosa é composta por células ricas em grânulos de queratohialina e em corpos lamelares. Os grânulos de queratohialina se tornam cada vez maiores à medida que as células alcançam as camadas mais superficiais da pele, devido ao aumento da síntese de queratina. Os corpos lamelares são organelas que contém lipídios, os quais são secretados para o meio intercelular à medida que a diferenciação celular acontece (MENON, 2002; WERTZ, 2000). A camada espinhosa se caracteriza pela grande quantidade de desmossomos e pela presença de corpos lamelares de Odland (MENON, 2002).

A camada basal constitui a interface entre a epiderme e a derme e consiste em uma única camada de células colunares que contém filamentos de queratina, e permanecem fixadas à membrana basal através de hemidesmossomos (MENON, 2002). As células desta camada são renovadas periodicamente e se deslocam em direção à superfície da pele. À medida que a migração acontece, as células sofrem diferenciação e se tornam cada vez mais queratinizadas, sendo que quando estão totalmente queratinizadas passam a ser denominadas de corneócitos, e permanecem no estrato córneo até que ocorra descamação (EDWARDS; MARKS, 1995).

A derme é a camada da pele localizada abaixo da epiderme (Fig. 1A), constituída por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas. Entre as células encontradas nessa camada estão as adiposas dérmicas, os mastócitos, os leucócitos e também os fibroblastos. Os últimos são responsáveis pela síntese de pró-colágeno, elastina e glicosaminoglicanos, que coletivamente compõem matriz extracelular (MENON, 2002). As principais funções da derme são nutrir a epiderme, que é uma camada avascular, e lhe proporcionar suporte mecânico (DALY, 1982).

A)



B)

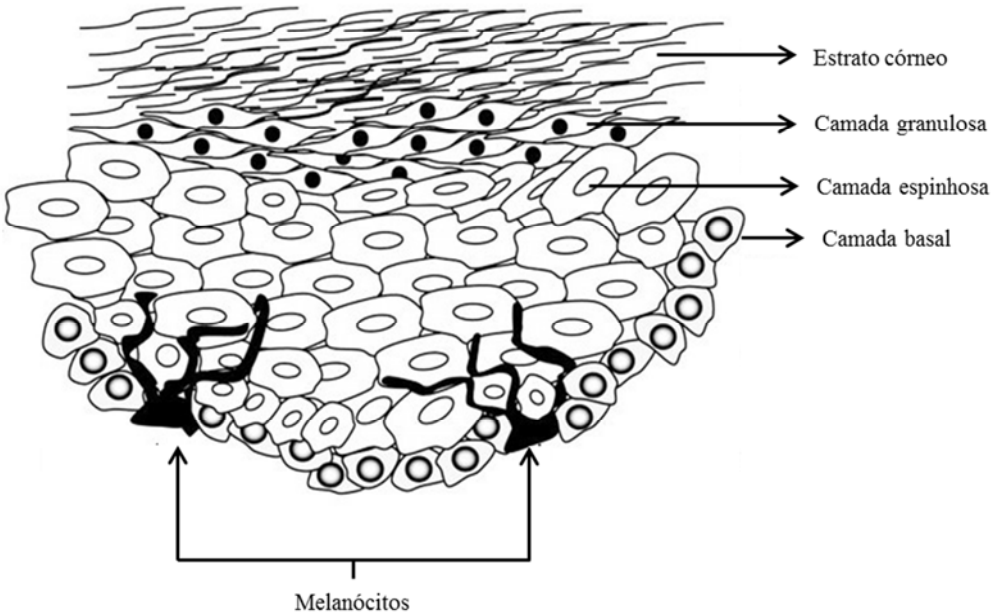


Figura 1 – Representação das camadas da pele **A)** e da epiderme **B)**.
Fonte: Adaptado de Bariya et al. (2012) e Costin e Hearing (2007).

A pele pode ser classificada em diferentes fototipos, em uma escala que varia de I (pele muito clara) a VI (pele negra), com base no sistema de classificação desenvolvido por Fitzpatrick, de acordo com sua cor e com o comportamento quanto à queimadura e

bronzeamento em decorrência da exposição ao sol (SACHDEVA, 2009; SAINT-LEGER, 2015). A classificação da pele em diferentes fototipos tem várias aplicações na dermatologia clínica, e pode ser útil, por exemplo, para definir estratégias de fotoproteção adequadas para prevenir o fotoenvelhecimento cutâneo e também reduzir o risco de câncer de pele (SACHDEVA, 2009).

Conforme mencionado anteriormente, entre as funções desempenhadas pela pele está a proteção contra a radiação solar (CHUONG et al., 2002; FUCHS et al., 1989). A radiação solar compreende os espectros do infravermelho, UV e da luz VIS. Sendo que cerca de 56%, 39% e 5% da radiação solar correspondem, respectivamente, aos raios infravermelhos (800nm-1mm), à luz VIS (400-760 nm), e à radiação UV (280-400nm) (GONZÁLEZ et al., 2008; ROMANHOLE et al., 2015).

Os raios UV compreendem a UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (200-280nm), sendo que a UVA e UVB são responsáveis por diversos efeitos deletérios sobre a pele, os quais podem se manifestar sob a forma de eritema ou queimadura solar, fotoenvelhecimento, lesões cancerosas e pré-cancerosas, entre outros (ROMANHOLE et al., 2015; SIMIS; SIMIS, 2006). Os danos fotoinduzidos pela radiação UV tem início na absorção dessa radiação por cromóforos endógenos, tais como o DNA, a melanina, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos, entre outros (ROMANHOLE et al., 2015). Esses danos podem ocorrer por meio da reação direta entre os cromóforos excitados e o DNA (reação tipo I), ou por transferência de energia para o oxigênio molecular (reação tipo II), o que leva a formação de $O_2^{-\bullet}$ e de $^1O_2$ (MORI et al., 1988; UMLAS et al., 1985), que é uma molécula altamente eletrofílica capaz de reagir com duplas ligações de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (MICHAELI; FEITELSON, 1994). O $^1O_2$ pode ser formado no organismo através de reações fotoquímicas por meio da transferência de energia de uma molécula excitada (no estado tripleto) para o oxigênio molecular (SIES; MENCK, 1992).

Os raios UVA são capazes de penetrar profundamente a derme (Fig. 2), sendo que a exposição a esses raios induz à geração de EROS, como o $^1O_2$ por meio da fotossensibilização de cromóforos endógenos (TYRREL, 1994), o que pode causar danos às macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (NICHOLS; KATIYAR, 2010). A UVA possui potencial genotóxico, ou seja, é capaz de produzir mutações em células humanas normais e, por isso, pode induzir à carcinogênese. Além disso, a radiação UVA está relacionada ao fotoenvelhecimento e à diminuição da hidratação e elasticidade da pele (LAVKER et al., 1995).

A luz VIS corresponde à porção do espectro eletromagnético visível ao olho humano e é capaz de atingir camadas ainda mais profundas que a derme (Fig. 2) (ROTTIER; VANDERLEUN, 1960). Essa faixa da radiação solar emite fótons que, ao incidirem na pele, assim como os fótons da UV, são absorvidos por cromóforos e iniciam reações químicas que podem provocar alterações moleculares nas células. Diversos cromóforos endógenos absorvem luz VIS, incluindo a protoporfirina, a bilirrubina, a hemoglobina e a melanina (MAHMOUD et al., 2008).

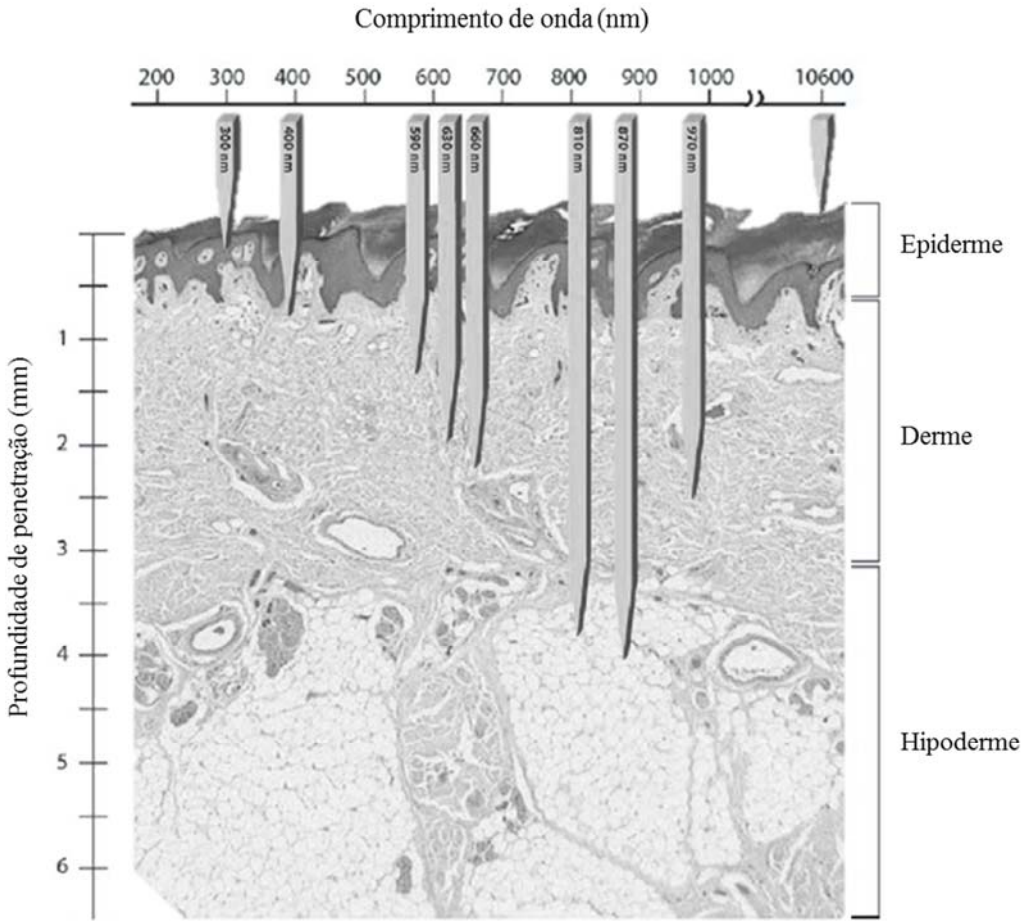


Figura 2 – Representação da profundidade de penetração da radiação solar nas das camadas da pele.
Fonte: Adaptado de Campos et al. (2015).

Durante muito tempo, a contribuição da luz VIS nos efeitos adversos provocados pela radiação solar foi subestimada. No entanto, estudos têm mostrado que a luz VIS é capaz de causar efeitos na pele semelhantes aos provocados pela radiação UV, tais como eritema (PARRISH et al., 1982), pigmentação (KOLLIAS; BAQER, 1984; MAHMOUD et al., 2010) e, sobretudo, estresse oxidativo devido à geração de EROS (LIEBEL et al., 2012).

Vandersee et al. (2015) avaliaram a influência da luz VIS sobre o conteúdo de carotenoides na pele humana *in vivo* e observaram que houve degradação significativa dos carotenoides após irradiação. Assim, os autores demonstraram de forma indireta que radicais livres, e provavelmente EROS, são geradas na pele após exposição à luz VIS.

Os efeitos da luz VIS sobre a pele humana também foram estudados por Zastrow et al. (2009) que, em estudo *ex vivo*, mostraram que ocorre excesso de produção de radicais livres na pele irradiada. Altos níveis de radicais livres após exposição à luz VIS também foram observados em modelos clínicos para avaliar a geração de radicais livres (LIEBEL et al., 2012). Além disso, os resultados dos estudos *in vitro* mostraram que a luz VIS induziu à expressão de MMP-I e à produção de EROS e citocinas pró-inflamatórias (LIEBEL et al., 2012). Esses resultados sugerem que a luz VIS também pode contribuir para o fotoenvelhecimento prematuro da pele.

Baptista et al. (2012) observaram em estudo *in vitro* que a luz VIS pode induzir à fototoxicidade em macrófagos, queratinócitos e melanócitos, e que esse processo é dependente do tipo e da quantidade de melanina intracelular, uma vez que a viabilidade celular foi reduzida em 20% nas células que produziam excesso de melanina após exposição à luz VIS. Além disso, também foi observado que nas células com grande quantidade de melanina houve aumento de 30 % da produção de $^1O_2$ comparado com as células controle.

Alguns autores demonstraram experimentalmente os efeitos genotóxicos da luz VIS sobre culturas de melanoma e queratinócitos, uma vez que observaram danos ao DNA após irradiação (BOTTA et al., 2008; HOFFMANN-DORR et al., 2005). Os resultados do estudo de Hoffmann-Dorr et al. (2005) indicam que a genotoxicidade ocorre devido aos danos oxidativos gerados por fotossensibilizadores.

2.2 Melanócitos e melanina

Os melanócitos são células dendríticas, derivadas de células precursoras (melanoblastos) originadas na crista neural durante o desenvolvimento embrionário, responsáveis pela síntese e distribuição da melanina (CICHOREK, WACHULSKA; STASIEWICZ, 2013; COSTIN; HEARING, 2007). Ao microscópio, os melanócitos maduros se apresentam como células dendríticas de forma oval ou fusiforme (Fig. 3) (CICHOREK et al., 2013).

O ciclo de vida dos melanócitos se inicia com a especificação da linhagem celular nas células embrionárias da crista neural (melanoblastos) e a migração dos melanoblastos para a membrana basal da epiderme, onde ocorre sua proliferação, seguida da sua diferenciação em

melanócitos (CICHOREK et al., 2013). A migração, proliferação e diferenciação dos melanoblastos em melanócitos são dependentes de mediadores produzidos por células do tubo neural, da ectoderme e por queratinócitos, como por exemplo, a endotelina-3 (ET-3), moléculas da família de glicoproteínas Wnt, e o fator de células-tronco (CICHOREK et al., 2013; UYEN et al., 2008). Os melanócitos passam então por um processo de maturação, que resulta na formação de melanina no interior dos melanossomas. Em seguida, ocorre o transporte dos melanossomas maduros para os queratinócitos. A forma dendrítica dos melanócitos favorece seu contato com os queratinócitos e permite a transferência dos grânulos de melanina, que se acumulam sobre o núcleo, para essas células. Apesar de alguns modelos já terem sido propostos, o mecanismo exato pelo qual os melanossomas são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos permanece desconhecido (CICHOREK et al., 2013).

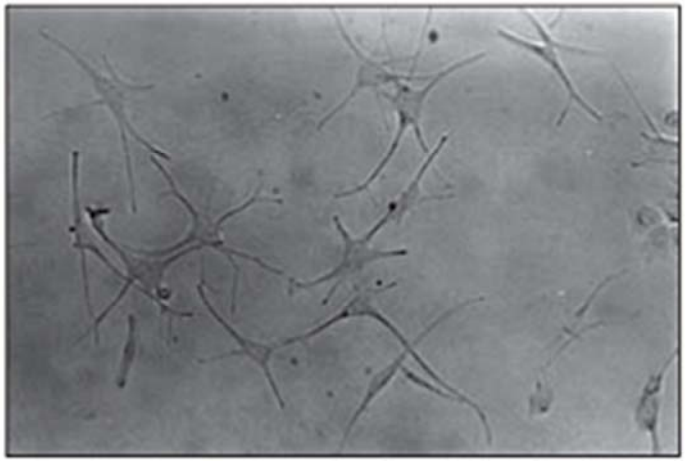


Figura 3 – Imagem de melanócitos primários em cultura obtida em microscópio invertido no aumento de 200x.
Fonte: REHDER et al., 2004.

No processo de melanização os melanossomas, localizados no citoplasma dos melanócitos, passam por quatro estágios de maturação que resultam na formação de melanina. Para que esse processo ocorra é necessário que a tirosina, a enzima tirosinase e as proteínas relacionadas à tirosinase (TRP-1 e TRP-2) estejam presentes. Nos estágios iniciais de desenvolvimento do melanossoma, I (pré-melanossoma) e II, não há síntese de melanina e ocorre a construção da matriz fibrilar, que é constituída por glicoproteínas (Pmel17 ou gp100, e MART-1). Nos estágios III e IV ocorre a síntese da melanina, que é depositada na matriz fibrilar provocando espessamento e escurecimento das estriações. No estágio IV, o melanossoma é totalmente preenchido por melanina. Ao final desse processo, os

melanossomas, já totalmente melanizados, perdem a atividade da tirosinase e são então transferidos para os queratinócitos (CICHOREK et al., 2013).

A síntese de melanina ocorre mediante determinados estímulos químicos e físicos. Dois tipos de melanina podem ser produzidos nos melanossomas: a eumelanina e a feomelanina (Fig. 4), as quais diferem na cor, nas unidades monoméricas que as compõem e no mecanismo de síntese. A eumelanina é um polímero insolúvel de cor preta/marrom, e a feomelanina, um polímero solúvel de cor amarela/vermelha (SIMON; PELES, 2010). As reações envolvidas na melanogênese, são iniciadas com a hidroxilação da tirosina pela tirosinase formando a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que é rapidamente oxidada à dopaquinona. Este intermediário pode dar origem tanto à eumelanina quanto à feomelanina. Na presença da cisteína ou glutationa ocorrem reações que levam à formação de feomelanina. A eumelanogênese, ou formação de eumelanina, ocorre na ausência de cisteína, ou de outras moléculas que apresentam grupos tiol como, por exemplo, a glutationa (CICHOREK et al., 2013; EBANKS et al., 2009; SIMON et al., 2009).

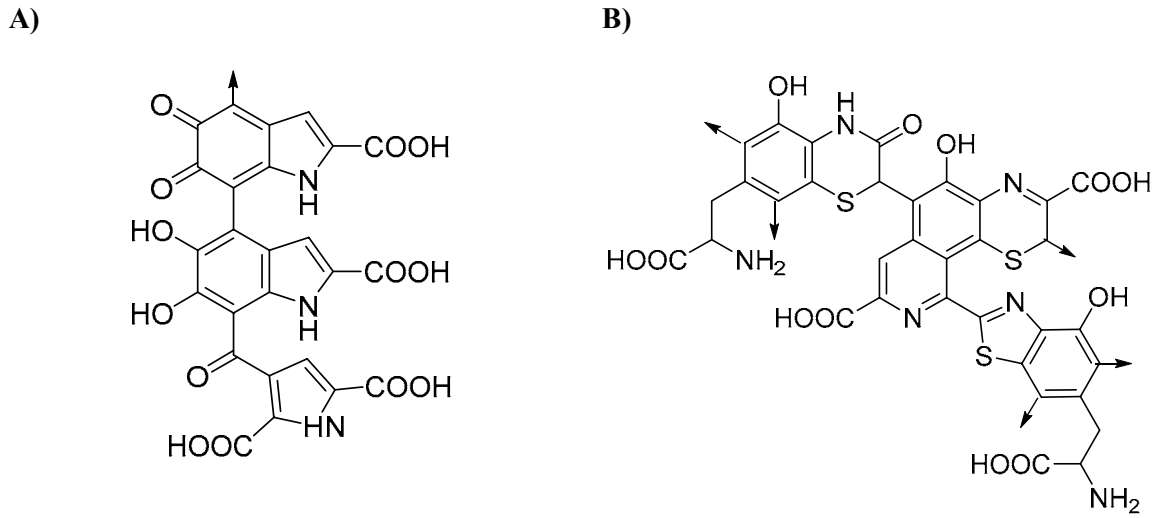


Figura 4 – Estrutura molecular dos monômeros que constituem a **A)** eumelanina e **B)** feomelanina.
Fonte: Adaptado de Simon et al. (2009).

O espectro de absorção da melanina abrange comprimentos de onda entre 200 e 900nm (ZONIOs et al., 2008) e, por isso, possibilita a proteção da pele contra os danos fotoinduzidos pela radiação solar e luz VIS. Essa proteção pode ocorrer por meio da absorção da luz (UV e VIS), reduzindo sua penetração na pele e impedindo sua interação com outras biomoléculas, ou pelo espalhamento da mesma (BRENNER; HEARING, 2008; ZONIOS et al., 2008). Outro mecanismo de proteção baseia-se na ação antioxidante deste pigmento, uma

vez que nos processos fotoinduzidos a melanina pode sequestrar e/ou suprimir as espécies reativas geradas, tais como o $O_2^{-\bullet}$ e o $^1O_2$ (TADA et al., 2010).

O efeito fotoprotetor da melanina foi demonstrado em estudos epidemiológicos, nos quais foi observado que a cor da pele e a incidência de cânceres de pele induzidos pelo sol estão inversamente relacionadas, e que indivíduos de pele clara tem uma propensão 70 vezes maior em desenvolver câncer de pele do que indivíduos de pele escura (BRENNER; HEARING, 2008). Esses estudos sugerem que a eumelanina possui propriedades fotoprotetoras superiores à feomelanina, uma vez que a proteção contra a radiação UV foi melhor em pessoas de pele escura, que possuem elevado conteúdo de eumelanina, do que em pessoas de pele clara, que apresentam baixo conteúdo de eumelanina (BRENNER; HEARING, 2008). Além disso, o estudo de Tadokoro et al. (2003) reportou que nos Estados Unidos, a incidência de carcinoma basocelular e espinocelular é 50 vezes maior em caucasianos do que em afro-americanos, e que a incidência de melanoma em afro-americanos é 13 vezes menor do que em caucasianos.

Por outro lado, a melanina também pode apresentar propriedades tóxicas e atuar como pró-oxidante na presença da luz, uma vez que essa molécula pode sofrer fotossensibilização e gerar EROS, em especial o $^1O_2$ (SUZUKAWA et al., 2012). Na presença de radiação UV e luz VIS a melanina pode ser excitada ao estado singleto passando ao estado tripleto por meio da transição inter-sistemas e, como consequência, levar à formação de $^1O_2$ ou $O_2^{-\bullet}$ (CHEDEKEL et al., 1978; CHIARELLI-NETO et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2004; TOFFOLETTI et al., 2009). Apesar de melanina ser capaz de sequestrar essas espécies reativas, sua ação antioxidante pode ser suprimida (TAKEUCHI et al., 2004). Dessa forma, a melanina pode ter efeitos opostos no organismo, ou seja, pode desencadear mecanismos de proteção e também de danos à pele quando exposta à radiação solar.

A eumelanina e a feomelanina apresentam diferentes propriedades redox, sendo que, de maneira geral, assume-se que a eumelanina possui papel protetor, enquanto a feomelanina é considerada nociva (SUZUKAWA et al., 2012). Isso se deve ao fato de a feomelanina ser mais susceptível à fotodegradação, ao contrário da eumelanina, sendo que alguns autores sugerem que sua contribuição para os efeitos deletérios da radiação UV é devida à geração de $O_2^{-\bullet}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BRENNER; HEARING, 2008).

2.3 Antioxidantes no contexto da fotoproteção

Um radical livre pode ser definido como uma molécula que apresenta um elétron desemparelhado em um orbital atômico. A presença de um elétron desemparelhado resulta em

instabilidade molecular e alta reatividade, que são propriedades comuns à maioria dos radicais. Esses radicais podem então doar ou receber elétrons de outras moléculas, atuando como oxidantes ou redutores (CHEESEMAN; SLATER, 1993). Nos sistemas biológicos, os radicais livres geralmente são derivados do oxigênio, do nitrogênio e do enxofre, e pertencem a grupos de moléculas denominados EROS, espécies reativas de nitrogênio (ERNS) e espécies reativas de enxofre (ERSS), respectivamente (LUE et al., 2010). Entre as principais EROS temos os radicais $O_2^{-\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, alcoxil ($RO^{\bullet}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$), H_2O_2 e $^1O_2$ (LOBO et al., 2010; PIETTA, 2000).

A geração de EROS no organismo pode ocorrer durante os processos metabólicos normais do organismo por meio de reações enzimáticas, envolvidas na cadeia respiratória, ou não enzimáticas, que ocorrem, por exemplo, entre o oxigênio e compostos orgânicos (LOBO et al., 2010). Além disso, as EROS podem ser formadas após incidência das radiações UVA e UVB e da luz VIS sobre a pele devido à absorção dos fótons pelos cromóforos da pele, os quais passam a um estado excitado, por transição eletrônica, podendo sofrer reações fotoquímicas que resultam na formação de tais espécies reativas (LIEBEL et al., 2012; WLASCHEK et al., 2001). O desequilíbrio entre a produção de EROS e o sistema antioxidante do organismo, ou seja, estresse oxidativo, caracteriza uma condição na qual ocorrem danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (LOBO et al., 2010). O estresse oxidativo contribui significativamente para o envelhecimento e para o surgimento de diversas doenças, entre elas o câncer (LUE et al., 2010).

Para retardar, prevenir ou inibir os danos oxidativos às células são utilizados os antioxidantes, que são moléculas capazes de inibir ou impedir reações iniciadas por radicais livres (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Os antioxidantes enzimáticos neutralizam e removem os radicais livres por meio de vários mecanismos como, por exemplo, através da transformação do $O_2^{-\bullet}$ em H_2O_2 (superóxido dismutase) e do H_2O_2 em água (catalase) (NIMSE; PAL, 2015).

De forma geral, os antioxidantes não enzimáticos podem neutralizar os radicais livres por meio de dois mecanismos principais, que consistem na remoção de um átomo de hidrogênio do antioxidante pelo radical, e na transferência de um elétron do antioxidante para o radical (LEOPOLDINI et al., 2004). Mais especificamente, os antioxidantes podem proteger a pele contra os radicais livres inibindo sua formação ou interrompendo sua propagação por meio de um, ou mais, dos seguintes mecanismos: 1) interceptação das espécies pró-oxidantes iniciais; 2) seqüestro de metais pesados, prevenindo eventos de iniciação e propagação das reações que produzem radicais livres; 3) interceptação de radicais secundários os quais podem

propagar reação em cadeia ou reduzir grupos oxidados; 4) reparo de macromoléculas e renovação celular (TEDESCO et al., 1997). As moléculas antioxidantes reagem com os radicais livres e os neutralizam, sendo que nesse processo os antioxidantes se tornam radicais menos ativos, menos prejudiciais, e com maior tempo de vida do que os radicais livres que foram neutralizados. Esses radicais menos ativos podem então ser neutralizados por outros antioxidantes ou por outros mecanismos para eliminar a forma de radical (LUE et al., 2010).

O organismo possui antioxidantes endógenos enzimáticos (glutationa peroxidase, catalase, superóxido dismutase, entre outros) e não enzimáticos (glutationa, ubiquinol e ácido úrico) eficientes no combate às EROS geradas na pele (SHI et al., 1999; STEENVOORDEN; VAN HENEGOUWEN, 1997). Além disso, a vitaminas E (alfa-tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico) e o beta-caroteno, provenientes da dieta, também tem importante papel no sistema de defesa antioxidante do organismo (LEVINE et al., 1991). Entretanto, a exposição à radiação UV e à luz VIS induz a uma produção excessiva de tais espécies, que supera a capacidade protetora intrínseca ao organismo humano (BLACK et al., 1983; LIEBEL et al., 2012).

O conhecimento sobre os diversos efeitos deletérios que os raios UV e a luz VIS podem provocar na pele, bem como a crescente incidência de casos de câncer de pele na população mundial, tem gerado preocupação em relação à proteção contra a radiação solar (JOU et al., 2012). Durante muito tempo, o delineamento de protetores solares restringiu-se a obter formulações que conferissem proteção UVA e UVB. É fato conhecido que no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras é importante utilizar combinações de filtros solares que proporcionem proteção adequada na faixa da UVA e da UVB (JOU et al., 2012). Entretanto, os avanços das pesquisas na área de fotoproteção (LIEBEL et al., 2012; VANDERSEE et al., 2015) mostraram a necessidade de estender o espectro de proteção para a faixa da luz VIS (400-760 nm). Atualmente, não há no mercado filtros solares orgânicos que apresentam proteção nessa faixa de radiação. Assim, o uso de antioxidantes nas formulações fotoprotetoras torna-se a melhor alternativa para conseguir a referida proteção, uma vez que os danos provocados à pele pela luz VIS são causados principalmente por EROS.

Nos últimos anos surgiu uma tendência em associar aos filtros solares substâncias com atividade antioxidante visando melhorar o potencial das formulações para prevenir ou minimizar os danos induzidos pela radiação UV, uma vez que os filtros solares não oferecem proteção total contra as espécies reativas (EPSTEIN, 2011). Dessa forma, a adição de antioxidantes aos fotoprotetores pode, além de complementar a proteção UVA, proporcionar proteção VIS. Liebel et al (2012) demonstraram que o uso de uma formulação fotoprotetora

fotoestável contendo uma combinação de antioxidantes reduziu significativamente a produção de EROS e a expressão de MMP *in vitro*, bem como o estresse oxidativo em humanos após irradiação com luz VIS.

Diversos antioxidantes naturais têm sido empregados em protetores solares devido às suas propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, tais como vitaminas, flavonoides e carotenoides (GONZÁLEZ et al., 2008, 2010; GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010). Os flavonoides podem atuar como antioxidantes por diversos mecanismos de ação, que se baseiam no *quenching* direto de EROS, na inibição de enzimas, na regeneração de antioxidantes ligados à membrana e na ação quelante de íons metálicos, como o Fe^{3+} e o Cu^{+} (LEOPOLDINI et al., 2004). Entre os antioxidantes clássicos empregados em fotoprotetores estão as vitaminas C e E, e o beta-caroteno, cujos efeitos fotoprotetores contra os raios UV são bem caracterizados (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; GONZÁLEZ et al., 2008; PINNELL, 2003).

Estudos da literatura indicam que alguns antioxidantes, tais como a apigenina, a crisina e o beta-caroteno podem neutralizar o $^{1}O_2$ (BOHM et al., 1993; NAGAI et al., 2005). Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar $^{1}O_2$ e provocar estresse oxidativo, a apigenina, a crisina e o beta-caroteno se tornam antioxidantes em potencial para prevenir ou minimizar o impacto desses eventos sobre a pele.

A apigenina (Fig. 5) é um flavonoide pertencente à classe das flavonas, encontrada em plantas e frutas (MCKAY; BLUMBERG, 2006). A apigenina apresenta atividade antioxidante (BEGUM et al., 2012), anti-inflamatória (JEONG et al., 2009) e anti-câncer (SILVAN et al., 2011). Um estudo da literatura também sugere que essa flavona exerce potente atividade melanogênica, já que provocou aumento da expressão de três enzimas envolvidas na síntese de melanina (YE et al., 2010).

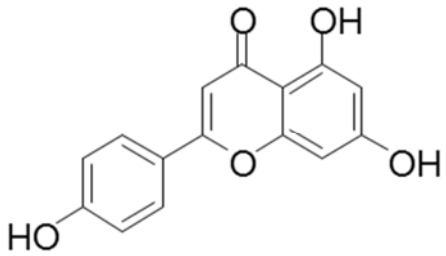


Figura 5 – Estrutura molecular da apigenina.

De acordo com Das et al. (2013) a apigenina foi capaz de proteger queratinócitos humanos e a pele de camundongos contra os efeitos deletérios da radiação UVB, uma vez que houve proteção do DNA através da redução da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano, da inibição da geração de EROS, e da redução da expressão do fator nuclear kappa-B e da proteína quinase ativada por mitógeno p38.

A crisina (Fig. 6) é uma flavona presente extratos de plantas, própolis e mel (PICHICHERO et al., 2010). Assim como outros flavonoides, a crisina apresenta atividades biológicas, tais como ações anti-inflamatória (CHO et al., 2004), anti-câncer (KHAN et al., 2011; PICHICHERO et al., 2010) e antioxidante (BORS et al., 1997). Além disso, os resultados do estudo de Kim et al. (2011) sugerem que a crisina pode ser usada como inibidor da hiperpigmentação, uma vez que foi capaz de inibir a melanogênese *in vitro*.

O potencial de uso da crisina na fotoproteção da pele foi sugerido por Wu et al. (2011) após verificarem que a mesma pode atenuar a apoptose, a produção de EROS e a expressão da ciclooxigenase-2 induzidas pela radiação UV, e também reverter a redução da expressão de aquaporina-3 induzida pela UVB.

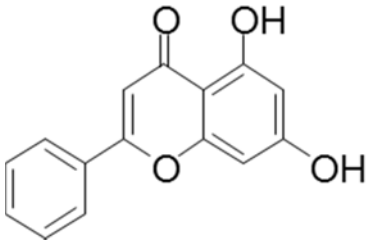


Figura 6 – Estrutura molecular da crisina.

Adicionalmente, a apigenina e a crisina mostraram-se efetivas no seqüestro de espécies reativas e na inibição da MMP -1, a qual regula o processo de fotoenvelhecimento da pele induzido por espécies reativas geradas pela exposição à UVA (SIM et al., 2007).

O estudo realizado por Nagai, Ohara e Mukai (2005) sugere que a apigenina e a crisina podem atuar como *quenchers* de $^1O_2$ em sistemas biológicos, e que a capacidade de atuar como *quencher* depende do número de hidroxilas, sendo maior nos flavonoides com mais hidroxilas. Foi demonstrado, por meio de um ensaio que quantifica a capacidade de redução com base no consumo de um oxidante padrão (Ce^{4+}), que a apigenina e a crisina também podem atuar como redutores (FERREIRA et al., 2015). Além disso, Leopoldini et al. (2004) sugerem que a atividade antioxidante da apigenina também pode ocorrer pelo mecanismo de transferência de um elétron.

O beta-caroteno (Fig. 7) é o mais abundante e eficiente precursor da vitamina A, o qual apresenta elevada ação antioxidante (DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998), devida principalmente a sua habilidade em suprimir o $^1O_2$ (BOHM et al., 1993), e também atividades anti-câncer (GURUVAYOORAPPAN; KUTTAN, 2007) e antiinflamatória (BAI et al., 2005; OBERMULLER-JEVIC et al., 2001).

A ação antioxidante do beta-caroteno está baseada na sua capacidade de atuar como *quencher* do $^1O_2$ e de substâncias no estado tripleto, dissipando a energia do estado excitado (MORTENSEN, 2001; NIELSEN et al., 1998). A estrutura molecular do beta-caroteno, caracterizada pela presença de numerosas duplas ligações conjugadas (Fig. 7), é responsável por sua excelente habilidade em atuar como *quencher* do singleto sem sofrer degradação e também por sua reatividade química frente a radicais livres (BRITTON, 1995; KRINSKY, 1994). Outro mecanismo pelo qual o beta-caroteno atua como antioxidante consiste na inibição da oxidação provocada por radicais $ROO^{\bullet}$ (YANISHLIEVA et al., 1998) e $O_2^{-\bullet}$ (CONN et al., 1992) por meio da transferência de elétrons para essas espécies reativas.

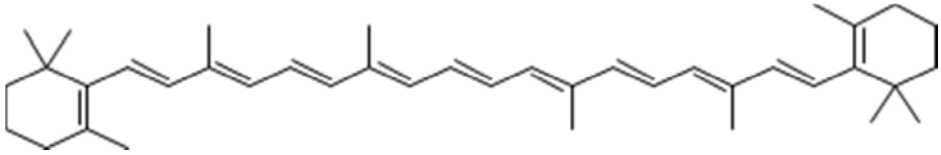


Figura 7 – Estrutura molecular do beta-caroteno.

Diversos estudos relataram a proteção oferecida pelo beta-caroteno contra a radiação UV e também infravermelha (BANDO et al., 2004; DARVIN et al., 2011; O'CONNOR; O'BRIEN, 1998). No estudo realizado por Darvin et al. (2011), a aplicação tópica de uma formulação contendo beta-caroteno conferiu proteção à pele humana contra a ação de radicais livres, formados em consequência da exposição à radiação infravermelha. Outros estudos *in vivo* também mostraram que a aplicação tópica de beta-caroteno conferiu proteção contra o estresse oxidativo induzido pela radiação UVA (EVELSON et al., 1997; YASUI; SAKURAI, 2000).

2.4 Avaliação de segurança e eficácia

Em se tratando de matérias-primas e produtos cosméticos, há uma forte tendência na Europa e também no Brasil em banir o uso de animais de experimentação para avaliação da sua eficácia e segurança. Apesar de a legislação brasileira ainda permitir que testes em

animais, visando avaliação da eficácia e segurança, sejam realizados para fins de registro de produtos cosméticos, o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2012a), recomenda a utilização de alguns testes *in vitro* validados pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) para este fim. Além disso, as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) n° 17 e n° 18, publicadas em 2014, reconhecem o uso de métodos alternativos à experimentação animal em todo país e estabelecem que até 2019 o método original deve ser substituído pelo método alternativo, sendo que a legislação não se restringe a matérias-primas e produtos cosméticos. Na Resolução Normativa n° 18, são reconhecidos 17 métodos alternativos, todos aceitos pela OECD, incluindo o teste de fototoxicidade 3T3 NRU.

O uso de moléculas antioxidantes que sejam eficazes e seguras é fundamental para o desenvolvimento de fotoprotetores visando uma proteção de amplo espectro, ou seja, na faixa da UVA/UVB e da luz VIS. A apigenina, a crisina e o beta-caroteno apresentam estrutura molecular caracterizada pela presença de anéis aromáticos (Figs. 5, 6 e 7) e estão sujeitos à excitação pela radiação UV e, no caso do beta-caroteno, também pela luz VIS (Fig. 8). Essa característica é vantajosa, pois esses antioxidantes poderiam atuar como filtros solares; mas por outro lado pode representar um risco, uma vez que, após absorver luz, compostos fotoinstáveis, passam facilmente por reações fotoquímicas que podem ocorrer tanto no estado excitado singleto quanto no estado excitado tripleto, que levam a geração de radicais livres e fotoprodutos (EPE, 2012; SHAATH, 2010). A produção de EROS, tais como o $^1O_2$ e o $O^{2-\bullet}$, pode estar envolvida em respostas fototóxicas, incluindo a fotoirritação, a fotogenotoxicidade e a fotoalergia (ONOUE; TSUDA, 2006).

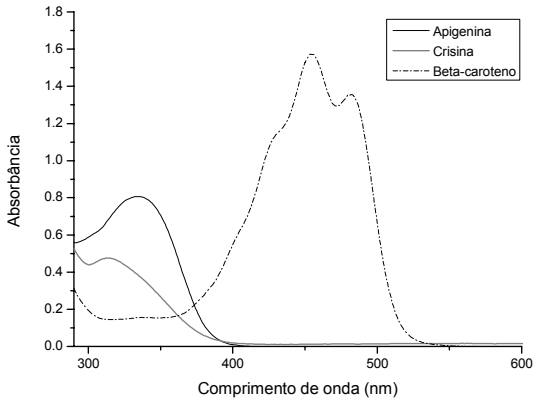


Figura 8 – Espectro de absorção da apigenina, crisina e beta-caroteno (16 $\mu g.mL^{-1}$) em solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70).

Entre os métodos *in vitro* utilizados na avaliação da segurança na presença da luz estão os propostos pelo guia *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10* (ICH, 2013). De acordo com esse guia, a avaliação da segurança *in vitro* está fundamentada basicamente na determinação do Coeficiente de Extinção Molar (> 1000 L $mol^{-1}cm^{-1}$) dentro da faixa da luz solar (290-700 nm), na determinação da geração de espécies reativas após absorção de UV/VIS (fotorreatividade) e na determinação de uma resposta aguda à uma substância que é aumentada ou iniciada após exposição à luz (fototoxicidade). Além disso, o estudo de fotoestabilidade também pode contribuir para avaliação da segurança, uma vez que pode sugerir um potencial para fotorreatividade (ICH, 2013). Com relação à eficácia *in vitro* de matérias-primas, existem diversas metodologias que podem ser empregadas para tal avaliação. A escolha da metodologia mais adequada vai depender do tipo de efeito ou característica que se pretende avaliar.

2.4.1 Fotoestabilidade

A fotoestabilidade é uma característica diretamente relacionada com a eficácia e segurança de protetores solares, uma vez que demonstra se a exposição à luz leva à degradação de uma substância. Ao serem excitadas pela luz, as moléculas passam do estado fundamental para o estado excitado singleto, onde a energia absorvida pode ser dissipada por meio de desativação vibracional ou da emissão de um fóton (fluorescência), ou a molécula excitada pode sofrer reações fotoquímicas, tais como fotodegração, formação de radicais e de fotoprodutos, as quais caracterizam fotoinstabilidade. Além disso, a molécula no estado excitado singleto, pode passar para o estado excitado tripleto, através da transição inter-sistemas, e dissipar a energia absorvida por meio da emissão de um fóton (fosforescência) ou sofrer reações fotoquímicas, que levam à formação de radicais $ROO^{\bullet}$ e de $^1O_2$ e também caracterizam fotoinstabilidade (LIM; DRAELOS, 2009; SHAATH, 2010). Assim, o ideal é que as moléculas retornem ao estado fundamental dissipando a energia UV absorvida, sem sofrer reações fotoquímicas.

Diversos estudos têm mostrado que a incidência de radiação UV sobre antioxidantes pode levar à redução ou perda da atividade antioxidante, devido à fotolabilidade e também à fotorreatividade frente ao UV (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; DAMIANI et al., 2006; HAYWOOD et al., 2003; MAIER et al., 2001, 2005; SERPONE et al., 2002). Alguns antioxidantes empregados em fotoprotetores como, por exemplo, a vitamina A, são muito fotoinstáveis (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007). Em um estudo realizado por Bonda, Zhang e Pavlovic (2011) foi reportado que o contato do *trans*-resveratrol com a radiação UV pode

reduzir significativamente a atividade antioxidante dessa molécula. Assim, o ideal é que os antioxidantes adicionados à formulação sejam estáveis frente à radiação solar para garantir sua eficácia, ou seja, para conferir proteção adequada contra as radiações UVA e VIS e garantir a manutenção de sua ação antioxidante após irradiação.

As descobertas sobre as consequências da utilização de antioxidantes fotoinstáveis em fotoprotetores tem atraído o interesse de vários pesquisadores em direção aos estudos de fotoestabilidade. Nesses estudos, a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) consiste no método analítico mais empregado; além de apresentar elevada sensibilidade e especificidade (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; FREITAS et al., 2015; GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006, 2010; MAIER et al., 2001).

Atualmente, a comunidade científica tem chamado atenção à necessidade da realização de estudos para avaliar a fotoestabilidade de substâncias empregadas em fotoprotetores. Os resultados desses estudos podem contribuir para avaliação da segurança, já que podem sugerir um potencial para fotorreatividade, e também impactar na eficácia do produto final, uma vez que pode ocorrer redução da quantidade de moléculas ativas e modificação de sua estrutura química após irradiação (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; NASH; TANNER, 2014; MARROT et al., 2004).

2.4.2 Fotorreatividade

A fotorreatividade consiste na propriedade que uma susbtância química tem de reagir com outra molécula após a absorção de fótons, o que pode levar à geração de EROS, tais como o $^1O_2$ e o $O^{2-\bullet}$ (JACVAM, 2013a).

O estudo de fotorreatividade é normalmente realizado para compostos que absorvem radiação em qualquer comprimento de onda entre 290 e 700 nm e que, como consequência da absorção, apresentam Coeficiente de Extinção Molar superior a 1000 L $mol^{-1}cm^{-1}$. Para compostos que apresentam Coeficiente de Extinção Molar inferior a 1000 L $mol^{-1}cm^{-1}$ entre 290 e 700nm, a realização de análises para avaliar sua segurança na presença da luz não é necessária (ICH, 2013).

O evento inicial no processo de fotossensibilização consiste na absorção de fótons no comprimento de onda que provoca excitação do cromóforo. A partir daí, podem ocorrer reações do tipo I, que ocorrem por meio da transferência de elétrons ou de hidrogênio levando à formação de radicais livres, ou do tipo II, que ocorrem por meio da transferência de energia da espécie excitada no estado tripleto para o oxigênio ou para biomoléculas (ONOUE et al., 2008). O princípio do estudo de fotorreatividade consiste no monitoramento da geração de

$O^{2-\bullet}$ através da reação tipo I (reação de transferência de um elétron) e de $^1O_2$ por meio da reação tipo II, uma vez que essas parecem ser as principais espécies envolvidas nas respostas fototóxicas. O ensaio de fotorreatividade pode ser usado para determinar o potencial fototóxico de um composto de forma indireta, já que estudos anteriores mostraram que a determinação de EROS a partir de substâncias irradiadas com UVA e luz VIS pode ser útil para reconhecer seu potencial fototóxico (JACVAM, 2013a).

O monitoramento da formação das EROS é feito utilizando um espectrofotômetro, sendo que a geração de $^1O_2$ é detectada pela redução da absorbância da p-nitrosodimetilanilina em 440nm, enquanto a geração de $O^{2-\bullet}$ é detectada pela redução do tetrazólio nitroazul, que leva ao aumento da absorbância em 560 nm (JACVAM, 2013a).

O ensaio de fotorreatividade possui baixa especificidade, o que pode gerar um grande número de resultados falso positivos, e elevada sensibilidade para prever substâncias que apresentam fototoxicidade *in vivo*. Assim, um resultado negativo neste ensaio indica que há uma baixa probabilidade de a substância apresentar fototoxicidade, enquanto um resultado positivo representa um sinal para dar continuidade à avaliação da segurança da substância em questão (ICH, 2013).

2.4.3 Fototoxicidade

A fototoxicidade ou fotoirritação consiste em uma resposta tóxica aguda a uma substância aplicada no corpo que pode ser iniciada ou aumentada após exposição à luz, ou que ocorre quando a pele é irradiada após administração sistêmica de uma substância (OECD, 2004). Algumas características parecem ser críticas para que uma substância demonstre fototoxicidade, entre elas temos: absorção de radiação dentro do espectro da luz solar (290-700 nm); geração de espécies reativas após absorção da radiação UV/VIS; e distribuição adequada nos tecidos expostos à luz como, por exemplo, a pele (ICH, 2013).

O ensaio *in vitro* mais amplamente utilizado para avaliar a fototoxicidade consiste no 3T3 *Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (3T3 NRU-PT)*, que pode ser utilizado para predizer efeitos fototóxicos agudos *in vivo* em animais e em humanos. Esse ensaio é capaz de identificar compostos que podem agir como fotoirritantes após aplicação tópica e distribuição na pele (OECD, 2004). Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, o 3T3 NRU-PT é único ensaio requerido para determinação da fototoxicidade aguda quando o composto não apresenta potencial fototóxico, já que um resultado negativo sugere uma baixa probabilidade de a substância ser fototóxica em humanos (LIEBSCH et al., 2005). No caso de um resultado positivo, temos que substâncias identificadas como fototóxicas provavelmente apresentarão

fototoxicidade após aplicação tópica ou após administração sistêmica e distribuição na pele (OECD, 2004). Entretanto, devemos dar continuidade à avaliação da segurança da substância que apresentar um resultado positivo, uma vez que esse ensaio superestima os resultados e não leva em consideração a biocinética e a biodisponibilidade das substâncias (ICH, 2013).

O princípio do teste de fototoxicidade 3T3 NRU consiste na comparação entre a citotoxicidade de uma substância na ausência e na presença de radiação, ou seja, o teste avalia a foto-citotoxicidade através da redução da viabilidade das células expostas a uma substância na presença da luz em relação à viabilidade na ausência da luz (OECD, 2004). Foram propostos dois modelos de predição para esse teste: o fator de fotoirritação (PIF) e o foto efeito médio (MPE). O primeiro relaciona a concentração capaz de reduzir a viabilidade das células em 50% (IC_{50}) obtida na ausência e na presença da luz. Já o MPE é uma medida derivada de uma análise matemática das curvas dose-resposta obtidas na ausência e na presença da radiação (PETERS; HOLZHUTTER, 2002).

2.4.4 FPS e FPUVA

Na avaliação da eficácia de protetores solares, contendo ou não antioxidantes, a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) e do Fator de Proteção UVA (FPUVA) é requerida, uma vez que o FPS reflete a eficácia do fotoprotetor em relação à radiação UVB, e o FPUVA em relação à UVA (BRASIL, 2012b). O FPS é definido como a relação entre a dose mínima de radiação UV necessária para produzir uma reação de eritema na pele (DME) protegida por um fotoprotetor e a dose mínima de radiação UV necessária para produzir a mesma reação na pele desprotegida (BRASIL, 2012b). A dose mínima eritematosa (DME), por sua vez, é definida como a quantidade de radiação necessária para produzir a primeira reação de vermelhidão (eritematosa) perceptível com bordas claramente definidas, observada entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação UV (PATHAK; FITZPATRICK, 1993).

A ANVISA recomenda que a determinação do FPS seja realizada por métodos *in vivo* em humanos, utilizando estritamente os guias atualizados disponibilizados pela FDA e COLIPA (BRASIL, 2012b). Entretanto, existem também metodologias *in vitro,* baseadas em métodos espectrofotométricos, para realizar essa determinação, que apesar de não serem aceitas para fins de registro do produto, podem ser úteis como ferramenta de triagem durante o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras (MANSUR et al., 1986).

O FPUVA consiste na relação entre a dose mínima de radiação UVA necessária para produzir escurecimento pigmentário persistente na pele (DMP) protegida por um fotoprotetor e a dose mínima de radiação UVA necessária para produzir a mesma reação na pele

desprotegida. De acordo com a RDC nº 30 (BRASIL, 2012b), a dose mínima pigmentária (DMP) é definida como a dose mínima de radiação UVA requerida para produzir um escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas claramente definidas, observado entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA.

A ANVISA recomenda que a determinação do FPUVA seja realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro* reconhecidos e devidamente validados, e a amplitude da proteção UV deve ser avaliada por meio do comprimento de onda crítico. As medidas *in vivo* e *in vitro* do FPUVA devem seguir, respectivamente, o guia recomendado pela *Japanese Cosmetic Industry Association* e o guia disponibilizado pela COLIPA (BRASIL, 2012b).

Os métodos *in vitro* para determinação do FPUVA se baseiam em análises espectrofotométricas, que permitem a determinação da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico. Este último corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nm, e deve ser no mínino equivalente a 370 nm (BRASIL, 2012b). A razão UVA/UVB caracteriza a proteção UVA em relação à UVB (razão UVA/UVB) (DIFFEY, 1994). Além disso, outra medida espectrofotométrica consiste na avaliação da transmitância de um fino filme de fotoprotetor espalhado em um substrato áspero (lâminas de polimetilmetacrilato), ou na avaliação da absorbância de uma solução, após exposição a uma dose de radiação UV controlada (DIFFEY et al., 2000; VELASCO et al., 2011).

2.4.5 Determinação da ação antioxidante

A medida da ação antioxidante de compostos ou de uma formulação pode ser utilizada para avaliação da sua eficácia na proteção contra a radiação solar, tendo em vista que a radiação UVA e luz VIS podem causar danos cutâneos mediados pela ação de EROS (LIEBEL et al., 2012; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Entre os métodos *in vitro* mais utilizados para medida do potencial antioxidante de substâncias com base em reações químicas, estão os ensaios DPPH, ABTS e o de peroxidação lipídica (TBARS) (BERETTA; FACINO, 2010). O primeiro se baseia na determinação da capacidade da substância em capturar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um radical orgânico estável, reduzindo-o à hidrazina por meio da doação de um átomo de hidrogênio, o que leva à mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (KEDARE; SINGH, 2011). No ensaio ABTS, o cátion radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) é gerado pela reação do sal ABTS com um forte agente oxidante (persulfato de potássio ou permanganato de potássio), sendo então medida a habilidade da substância em

reduzir o radical ABTS por meio da doação de um átomo de hidrogênio; a presença de um antioxidante provoca a perda da coloração da solução inicial azul esverdeada (MILLER; RICEEVANS, 1997). Nesse ensaio a capacidade antioxidante das substâncias é normalmente comparada à do Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E (MILLER; RICEEVANS, 1997). Na avaliação da peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ocorre uma reação entre o malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação lipídica derivado de ácidos graxos poliinsaturados, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, que pode ser detectado espectrofotometricamente em 532 nm, sendo o resultado expresso em equivalentes de MDA (BOLIGON et al., 2014).

Os métodos *in vitro* usuais para determinar a atividade antioxidante de moléculas normalmente são baseados em sistemas homogêneos que não se aproximam do ambiente celular (ROBERTS; GORDON, 2003; RODRIGUES et al., 2012). A avaliação da capacidade antioxidante utilizando modelo mimético de lipossomas consiste em um método *in vitro* que possui uma vantagem sobre os demais por representar o ambiente celular, onde a membrana deve ser protegida. Nesse modelo, a fotoativação do dimetil azul de metileno pela luz VIS induz à geração de $^1O_2$ com consequente oxidação lipídica e aumento da permeabilidade da membrana à carboxifluoresceína, detectada pelo aumento na intensidade de fluorescência (BACELLAR et al., 2014).

Em relação aos métodos *in vivo*, a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) ocupa posição de destaque na dermatologia para medida da atividade antioxidante (PLONKA, 2009). Essa técnica consiste em um método de ressonância magnética que detecta substâncias paramagnéticas, ou seja, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. É possível identificar o radical a partir do espectro de RPE obtido, sendo que a intensidade do sinal permite estimar a quantidade de radicais formados (OROIAN; ESCRICHE, 2015). A técnica de RPE tem sido aplicada em diversos estudos *in vivo* para avaliar a proteção oferecida por substâncias com ação antioxidante aplicadas na pele antes da irradiação por radiação UV, VIS ou infravermelha (DARVIN et al., 2011; HAAG et al., 2014; SUWANNATEEP et al., 2012).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente projeto é investigar o potencial de uso da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra a radiação UVA e luz VIS através de ensaios *in vitro* para avaliar características relacionadas à sua segurança e eficácia.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método de CLAE que permita identificar e quantificar simultaneamente os antioxidantes em estudo;
- Avaliar a fotoestabilidade da apigenina, da crisina e do beta-caroteno, isolados e em combinação, quando submetidos à irradiação por UVA/VIS ou VIS;
- Avaliar a fotorreatividade dos antioxidantes em estudo, isolados e em combinação, quando submetidos à irradiação por UVA/VIS ou VIS;
- Avaliar a fototoxicidade dos antioxidantes em estudo, isolados e em combinação, frente à UVA/VIS ou VIS em culturas de fibroblastos (Balb/3T3 clone 31), melanócitos (Melan-a) e melanoma (B16F10);
- Quantificar a geração de oxigênio singleto a partir das células B16F10;
- Avaliar o efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina durante exposição à luz VIS em cultura de melanoma (B16F10);
- Avaliar o efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais e Reagentes

Abaixo estão listadas as matérias-primas utilizadas e, quando necessário, também estão descritos seu nome comercial e fornecedor.

- 1, 9-Dimetil azul de metileno, código 341088, Sigma;
- 5 (6) Carboxifluoresceína, código 21877, Sigma;
- Ácido Acético Glacial, PA, Synth;
- Ácido gálico, código G7384, Sigma;
- Água destilada e deionizada;
- Álcool etílico, PA, Synth;
- Álcool isopropílico, grau HPLC, J.T.Baker;
- Álcool isopropílico, PA, Synth;
- Álcool metílico, grau HPLC, J.T.Baker;
- Apigenina, código A3145, Sigma;
- Beta-caroteno, código C9750, Sigma;
- Bicarbonato de sódio, código S5761, Sigma;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, código M5655, Sigma;
- Cloreto de amônio, Synth;
- Cloreto de sódio, PA, Synth;
- Cloreto nitroazul de tetrazólio, código N6876, Sigma;
- Cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (vermelho neutro), código 1.01369.0025, Merck;
- Crisina, código C80105, Sigma;
- Dimetilsulfoxido, código D2650, Sigma;
- Dimetilsulfoxido, PA, Synth;
- Fosfato de potássio monobásico, PA, Synth;
- Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado, PA, Synth;
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado, PA, Synth;
- Fosfato de sódio monobásico dihidratado, PA, Synth;
- Imidazol, código I5513, Sigma;
- Lecitina de soja - SOLEC™ F, Solae;
- L-histidina, código H8000, Sigma;
- L-Tirosina, Sigma;

- Meio de cultura DMEM, código 00044, Vitrocell/Embriolife;
- Meio de cultura DMEM, código BR30003-05, LGC Biotecnologia;
- Meio de cultura Ham's F10, código BR30009-05, LGC Biotecnologia;
- Meio de cultura RPMI 1640, código 31800-022, Gibco / Life Technologies;
- Mix de antibióticos (penicilina e estreptomicina), código A5955, Sigma;
- Mix de antibióticos (penicilina/estreptomicina com antimicótico), código 000148, Vitrocell/Embriolife;
- Norfloxacino, código N9890, Sigma;
- Óxido de deutério, código 151882, Sigma;
- p-nitrosodimetilanilina, código D172405, Sigma;
- Protoporfirina IX, código 258385, Sigma;
- Quinina, código Q1125, Sigma;
- Reagente de Bradford – Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, BIO-RAD;
- Salicilato de octila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL SALICYLATE) – Neo Heliopan® OS, Symrise;
- Sephadex G-50, código G50150, Sigma;
- Tetrahidrofurano, PA, F. Synth;
- Tripsina (solução de tripsina/EDTA, código 000012), Vitrocell/Embriolife;
- Tripsina, código T4174, Sigma;
- TRIS (Hidróximetil Aminometano), Synth;
- Triton X-100, Sigma.

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Adventurer OHAUS;
- Balança analítica Shimadzu AUW220D;
- Balança analítica Shimadzu AY220;
- Centrífuga Heraeus Megafuge 16R;
- Centrífuga KASVI K14-0815A;
- Centrífuga para eppendorf refrigerada CENTRIFUGE 5804R;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250mm, 5µm);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, acoplado a um sistema de bombas (LC-10AT), detector UV-VIS (SPD-20A), e auto-injetor (SIL-20A);

- Detector de oxigênio singleto Edinburgh F900 Instrument (Edinburgh, Reino Unido), que consiste em: um laser de Nd:YAG acoplado a um OPO (Quantel laser Brilliant, 3W, Rainbow OPOTEC) regulado para excitação em 450 nm (5 ns em 10 Hz , 2 mJ/pulso); suporte de cubeta; filtro de silício; monocromador; fotomultiplicadora NIR PMT (R5509) da Hamamatsu (Hamamatsu Co., Bridgewater, NJ, EUA) resfriada por nitrogênio líquido; e um analisador multicanais rápido com 5ns/canal (MSA-300; Becker & Hickl, Berlim, Alemanha);
- Diodo emissor de luz (LED) vermelho com emissão em 633 nm;
- Espectrofotômetro Agillent 8453, Agillent;
- Espectrofotômetro Ocean Optics (USB 2000+UV-VIS-ES, Dunedin, FL, EUA) guiado por fibra ótica Ocean Optics (QP50-2-UV-VIS);
- Espectrofotômetro UV-2401 PC, Modelo TCC-240ª, Shimadzu;
- Estufa com termostato e controle de umidade Forma Series II 3110 com filtro HEPA Class 100, Thermo;
- Incubadora de CO_2, Forma Series II Water-Jacket, Thermo;
- Leitor de Microplacas TECAN Infinite M200, RChisto;
- Leitor de Microplacas μ Quant, Bio-Tec Instruments;
- Microscópio invertido Zeiss, Primo Vert, Zeiss;
- Microscópio invertido Carls Zeiss Jena, Zeiss;
- Microscópio Labomed Digi 2 1500;
- Peagômetro UltraBasic - Denver Instrument UB-10;
- Peagômetro MS Tecnopan modelo mPA-210;
- Pipetas automáticas;
- Pipetas de Pasteur;
- Radiômetro Amprobe SOLAR-100 Solar Power Meter (AMPROBE, Estados Unidos);
- Radiômetro Coherent FieldMate (serial 0306k06R) acoplado a detector MDL OP-2 VIS (serial 0436k06);
- Radiômetro UV-Meter (Dr. Hönle AG UV Technology, Gräfelfing/München, Germany) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA;
- Simulador Solar SOL-500 (Dr. Hönle AG, Planegg, Alemanha);
- Sistema de irradiação constituído por quatro lâmpadas fluorescentes tubulares OSRAM DULUX L 55W/840;
- Sonicador Ultracleaner 1400A, Unique;

- Sonicador Ultrasonic Clean Ultra Cleaner 750;
- Tubos de 2 mL, Eppendorf;
- Tubos Falcon de 15 e de 50 mL;
- Vidrarias em geral;
- Vórtex Genie 2, Scientific Insdustries.

4.1.3 Linhagens celulares

- Fibroblastos de camundongo Balb 3T3, clone 31;
- Melanócitos de camundongo Melan-a;
- Melanoma de camundongo B16F10.

4.2 Métodos

4.2.1 Estudo para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS

4.2.1.1 Desenvolvimento de validação do método de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas utilizando o cromatógrafo Shimadzu acoplado a bombas (LC-10AT), detector UV-VIS (SPD-20A) e auto-injetor (SIL-20A), e equipado com coluna de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250mm, 5µm).

As condições cromatográficas utilizadas nas análises estão descritas a seguir:

- Fase móvel (eluição por gradiente): eluição inicial constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (55:13,5:31,5, v/v) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 4 minutos, o qual foi mantido com eluição constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (0:30:70, v/v) por 13 minutos;
- Fluxo de fase móvel: 0,8mL.min^{-1};
- Volume de injeção: 20 µl;
- Comprimento de onda: 325 nm (apigenina e crisina) e 454 nm (beta-caroteno);
- Tempo de corrida: 35 minutos;
- Temperatura: ambiente.

A validação do método de CLAE foi realizada de acordo com o *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)* (ICH, 2005), e incluiu a avaliação da seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite inferior de quantificação (LIQ), precisão e exatidão intra- e inter-ensaio.

A seletividade foi determinada por meio da análise dos padrões para avaliar a separação dos antioxidantes e possíveis interferentes provenientes do solvente. Soluções de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) contendo as substâncias em estudo (16 $\mu g.mL^{-1}$), separadamente e em associação, foram analisadas. Como controle, 2 mL de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) foram colocados em um béquer e, após evaporação do solvente, o filme seco foi dissolvido no mesmo solvente.

Para avaliação da linearidade, diluições contendo a apigenina (API), a crisina (CRI) e o beta-caroteno (BTC) em solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) foram preparadas em triplicata, a partir de uma solução estoque (50 $\mu g.mL^{-1}$), nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu g.mL^{-1}$. As curvas de calibração foram construídas plotando os valores de área obtidos *versus* as concentrações conhecidas de cada substância. O método de ajuste de mínimos quadrados foi empregado para avaliar estatisticamente os resultados da linearidade através de uma linha de regressão e da inclinação, intercepto e coeficiente de correlação linear (r^2) correspondentes (ICH, 2005).

O LD e o LIQ foram determinados com base no desvio padrão da resposta (σ) e na inclinação da curva de calibração (S) por meio das Equações 1 e 2, respectivamente (ICH, 2005):

$$LD = \frac{3{,}3 \,.\, \sigma}{S}$$

Equação 1

$$LIQ = \frac{10 \,.\, \sigma}{S}$$

Equação 2

A precisão foi utilizada para avaliar a variabilidade do método de CLAE e expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR, %). A exatidão foi determinada pela comparação entre a média das concentrações determinadas experimentalmente após análise cromatográfica e as concentrações teóricas correspondentes, de acordo com a Equação 3. A determinação da precisão e da exatidão foi realizada por meio de análises intra e inter-ensaio, as amostras

foram analisadas em triplicata, em 3 dias consecutivos, utilizando três concentrações: baixa (2,5 µg.mL^{-1}), média (10 µg.mL^{-1}) e alta (40 µg.mL^{-1}).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100$$

Equação 3

4.2.1.2 Fonte de irradiação

Os estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade foram conduzidos utilizando radiação UVA/VIS ou apenas VIS emitida por um simulador solar SOL-500 (Dr. Hönle AG, Planegg, Alemanha) (Fig. 9A) equipado com uma lâmpada de arco de mercúrio que simula a distribuição espectral da luz solar natural (Fig. 9B). Em relação à irradiação por UVA, um espectro praticamente desprovido de UVB (< 320 nm) foi obtido utilizando um filtro com transmissão de 50% no comprimento de onda de 335 nm (Filtro H1, Dr. Hönle, Alemanha) (OECD, 2004). Para irradiação por luz VIS, um espectro quase desprovido de UVA (<400 nm) foi obtido através da filtração da UVA por meio de um filtro de policarbonato, que absorve cerca de 98% da radiação UVA e transmite 80% de VIS. As amostras foram irradiadas a uma distância de 24 cm da fonte de luz, recebendo um fluxo de 11.5mW/cm^2 de UVA e 54.7mW/cm^2 de VIS.

A)

B)

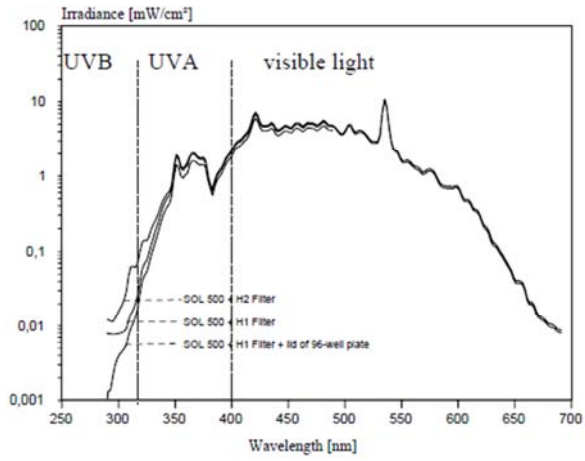


Figura 9 – Fonte de irradiação utilizada na triagem para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS: **A)** Sistema de irradiação composto por uma lâmpada de arco de mercúrio; **B)** Espectro de emissão do sistema de irradiação.
Fonte: protocolo *INVITTOX nº 78* (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002).

4.2.1.3 Estudo de fotoestabilidade

Foram preparadas soluções dos antioxidantes (50 $\mu g.mL^{-1}$) isolados (API, CRI e BTC) e combinados (API+CRI+BTC) em isopropanol:tetrahidrofurano (70:30). Alíquotas dessas soluções (2 mL) foram adicionadas em béqueres de vidro que, após evaporação total do solvente, foram expostos a 275 KJ/m^2 de radiação UVA (320-400 nm) e 1080 KJ/m^2 de luz VIS (400-800 nm) (DAMIANI et al., 2007; FREITAS et al., 2015), ou apenas a 1080 KJ/m^2 de luz VIS. Para cada béquer submetido à irradiação havia um controle negativo, ou seja, um béquer deixado ao abrigo da luz. Aos béqueres (controle e expostos à radiação) foram adicionados 2 mL de isopropanol:tetrahidrofurano (70:30) para a dissolução do filme seco em ultra-som e a solução resultante foi transferida para balão volumétrico de 5 mL (DAMIANI et al., 2007; FREITAS et al., 2015; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; KOCKLER et al., 2012). A fotoestabilidade dos antioxidantes em estudo foi avaliada em triplicata. As amostras das soluções, tanto as controle quanto as irradiadas por UVA/VIS ou VIS, contendo os antioxidantes em estudo foram submetidas à análise por CLAE utilizando o método descrito no item 4.2.1.1. Após análise por CLAE, a porcentagem de recuperação dos antioxidantes foi calculada através da relação entre a concentração do antioxidante na formulação irradiada e a sua concentração na formulação não irradiada multiplicada por um fator de 100.

4.2.1.4 Estudo de fotorreatividade

O ensaio para detecção das EROS foi conduzido para detectar a geração de $^1O_2$ (SO) e $O^{2-\bullet}$ (SA). Este estudo foi baseado no protocolo *ROS Assay Protocol Version 1.0* (JACVAM, 2013a) recomendado pelo *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) e aceito pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), o qual foi baseado em estudos de validação conduzidos pela JaCVAM (JACVAM, 2013b, 2013c; ONOUE et al., 2014).

4.2.1.4.1 Preparação das substâncias teste

As substâncias em estudo foram dissolvidas em DMSO nas concentrações de 1 mM (API, CRI, BTC e salicilato de octila) e 10 mM (norfloxacino e quinina) para obtenção das soluções estoque, imediatamente antes da sua utilização, protegidas da luz. Os antioxidantes isolados (API, CRI e BTC) foram testados na concentração de 1 mM (20 µM no meio reacional), e sua combinação (API+CRI+BTC) foi testada usando API 0,5 mM (10 µM no meio reacional), CRI 0,5 mM e BTC 1 mM. A quinina 10 mM (200 µM no meio reacional) e

o norfloxicino foram usados como controles positivos, e o salicilato de octila como controle negativo.

4.2.1.4.2 Procedimento para detecção de oxigênio singleto e ânion superóxido

O $^1O_2$ foi medido em solução aquosa através do monitoramento do branqueamento da p-nitrosodimetilanilina a 440 nm por espectrofotômetro, utilizando o imidazol como um aceptor seletivo para $^1O_2$. Os meios reacionais contendo as substâncias teste (10, 20 ou 200 µM), p-nitrosodimetilanilina (50 µM), e imidazol (50 µM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (NaPB, pH 7.4), foram preparados em um eppendorf. Duzentos microlitros dessa solução foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, e a medida da absorbância a 440nm foi então realizada em leitora de microplacas (µ Quant, Bio-Tec Instruments) e, em seguida, a placa foi irradiada com UVA (57 J/cm^2) / VIS (245 J/cm^2) ou VIS (245 J/cm^2). Por fim, após agitação, a absorbância das soluções presentes nos poços foi medida em 440 nm.

Para determinação do $O^{2-\bullet}$, os meios reacionais contendo as substâncias teste (10, 20 ou 200µM) e o tetrazólio nitroazul (NBT) (50 µM) em tampão fosfato de sódio 20 mM (NaPB, pH 7.4) foram preparados em um eppendorf. Duzentos microlitros dessa solução foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, e a medida da absorbância a 560 nm foi então realizada em leitora de microplacas (µ Quant, Bio-Tec Instruments) e, em seguida, a placa foi irradiada com UVA (57 J/cm^2) / VIS (245 J/cm^2) ou VIS (245 J/cm^2). Por fim, a redução de NBT no meio reacional foi medida através do aumento da absorbância a 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata (3 poços) em 2 corridas independentes (n=6).

De acordo com o protocolo *ROS Assay Protocol Version 1.0* (JACVAM, 2013a), uma substância é classificada como fotorreativa se SO $\geq$ 25 e SA $\geq$ 70, ou SO < 25 e SA $\geq$ 70, ou SO $\geq$ 25 e SA < 70. Uma substância que apresente SO < 25 e SA $\geq$ 20 ou < 70 é classificada como fracamente fotorreativa. Por fim, uma substância apresenta SO < 25 e SA < 20 é classificada como não-fotorreativa.

4.2.1.5 Estudo de fototoxicidade em cultura de fibroblastos (3T3 NRU), de melanócitos (Melan-a) e de melanoma (B16F10) em monocamadas

O estudo de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UVA/VIS ou VIS, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo *INVITTOX nº 78* (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002) e o guia *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*

Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (OECD, 2004). Para tal, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo Balb/3T3 clone 31 ATCC, a qual foi utilizada no estudo de validação do método realizado pela Comunidade Européia (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002). As culturas estabelecidas foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), 2% L-glutamina (v/v), 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina, e incubadas a 37 °C, em estufa de CO_2 (5%) com controle de umidade.

O teste de fototoxicidade também foi realizado em cultura de melanócitos murinos Melan-a e de melanoma murino B16F10. As células B16F10 foram cultivadas no meio HAM F10 suplementado com 10% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina, a 37 ºC em uma atmosfera com 5% de CO_2.

As células Melan-a foram cultivadas no meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de SBF, 200 nM do indutor de mitose Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina, a 37 ºC em uma atmosfera com 5% de CO_2 (GOH et al., 2013; OBA-SHINJO et al., 2006).

Previamente ao início dos estudos, foi avaliada a sensibilidade dos fibroblastos e melanócitos a cinco doses de radiação UVA/VIS (9/40, 15/70, 20/90, 25/110 e 30/130 J/cm^2) e VIS (40, 70, 90, 110 e 130 J/cm^2), sendo que a dose utilizada no estudo foi de 9J/cm^2 de UVA e 40J/cm^2 de VIS, uma vez que apenas nessas doses todas as linhagens apresentaram viabilidade celular superior a 80%.

No ensaio de fototoxicidade foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Foram inoculados 1 x 10^4 células em cada um dos 60 poços centrais de cada microplaca e os 36 poços laterais foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para a determinação da citotoxicidade (na ausência de UVA e VIS) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA ou VIS). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100 µL de oito diferentes concentrações de cada antioxidante isolado (6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) e também da combinação dos 3 antioxidantes, diluídos em DMSO e PBS. Na combinação, o BTC foi utilizado nas concentrações de 6,8, 10, 14,7, 21,5, 31,6, 46,4, 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$; e a API e a CRI nas concentrações de 3,4, 5, 7,35, 10,75, 15,8, 23,2, 34,05 e 50 $\mu g.mL^{-1}$. As duas microplacas foram incubadas por 1h e, a seguir, uma delas foi submetida à radiação UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2) ou VIS (40 J/cm^2), para a determinação da fototoxicidade. A outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e usada como um controle para a determinação

da citotoxicidade. Após a irradiação, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h e, a seguir, foi adicionado meio DMEM contendo uma solução de 50 $\mu g.mL^{-1}$ do corante vital vermelho neutro e as células foram incubadas por 3h a 37 °C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido por meio da aspiração do meio de cultura, e foram adicionados 150 µL em cada poço de uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por 49% de água, 50% de etanol e 1% de ácido acético.

Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi realizada a leitura de absorbância em 540 nm das soluções resultantes das microplacas, expostas ou não à radiação UVA/VIS ou VIS. Os valores de absorbância foram transferidos para o Software Phototox versão 2.0 (obtido no ZEBET, Alemanha) para análises dos dados e cálculo do PIF ("photo irritation factor" - fator de fotoirritação) e do MPE ("mean photo effect" - foto efeito médio), de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente, para posterior previsão do potencial fototóxico.

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{EC_{50}}\ (-\mathrm{UV/VIS})}{\mathrm{EC_{50}}\ (+\mathrm{UV/VIS})}$$

Equação 4

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \mathrm{W_i}\ \mathrm{PE_{c_i}}}{\sum_{i=1}^{n} \mathrm{W_i}}$$

Equação 5

De acordo com o guia *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test* (OECD, 2004), uma substância é classificada como fototóxica se apresentar MPE > 0,15 ou PIF > 5. Uma substância com MPE > 0,1 e < 0,15 ou PIF > 1 e < 5 é classificada como provavelmente fototóxica. Por fim, uma substância que apresenta PIF < 2 ou MPE < 0,1 é classificada como não fototóxica".

Os resultados correspondem à média de pelo menos dois experimentos independentes ± E.P.M. O norfloxacino e a protoporfirina IX foram usados como controle positivo para UVA/VIS e VIS, respectivamente. A L-histidina e o norfloxacino foram usados como controles negativos para UVA/VIS e VIS, respectivamente.

4.2.2 Avaliação da eficácia da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção contra os danos induzidos pela luz VIS

Os experimentos realizados para avaliar a proteção oferecida pela API, CRI e BTC contra os danos induzidos pela luz VIS foram realizados em colaboração com o Prof. Dr.

Mauricio da Silva Baptista, coordenador do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

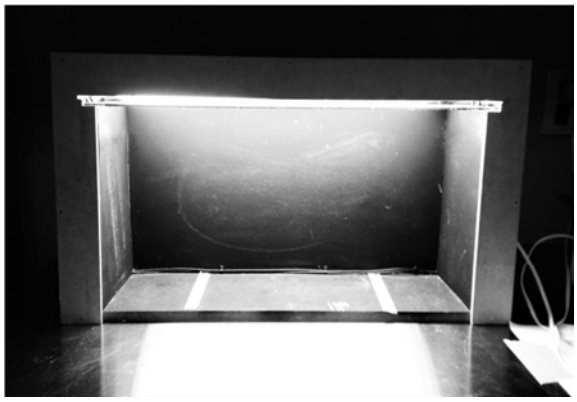
4.2.2.1 Estudo de proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10

As células B16F10 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina, a 37 ºC em uma atmosfera com 5% de CO_2.

4.2.2.1.1 Fonte de irradiação

Os estudos para avaliação da proteção oferecida pela API, CRI e BTC contra os danos fotoinduzidos pela luz VIS foram conduzidos utilizando a luz VIS emitida por sistema de irradiação composto por um arranjo de quatro lâmpadas fluorescentes tubulares OSRAM DULUX L 55W/840 (Fig. 10A), cujo espectro de emissão compreende vários picos na região do VIS (Fig. 10B). As amostras foram irradiadas a uma distância de 22 cm da fonte de luz, recebendo uma irradiância de 5,5 mW/cm^2 de luz VIS.

A)



B)

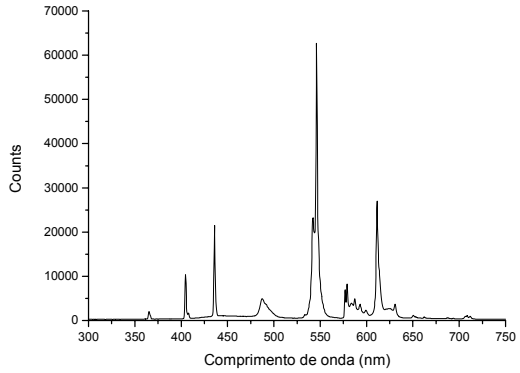


Figura 10 – Fonte de irradiação utilizada nos estudos de proteção contra os danos fotoinduzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10: **A)** Sistema de irradiação composto por um arranjo de quatro lâmpadas fluorescentes tubulares OSRAM DULUX L 55W/840; **B)** Espectro de emissão do sistema de irradiação obtido com um espectrofotômetro Ocean Optics (USB 2000+UV-VIS-ES) guiado por fibra ótica Ocean Optics (QP50-2-UV-VIS) – picos em 366, 305, 436, 490, 546, 585 e 612 nm.

4.2.2.1.2 Quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese

A indução da melanogênese foi realizada com base em estudos anteriores (CHIARELLI-NETO et al., 2014; CUNHA et al., 2012) utilizando diferentes concentrações de Cloreto de Amônio (NH_4Cl) (2,5, 5, 7,5 e 10 mM) e L-tirosina em uma concentração fixa de 1 mM. Para tal foram inoculadas 2,85 x 10^5 células em cada poço da microplaca de 6 poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 37 °C em estufa de CO_2. Após esse procedimento, foi realizada a indução da melanogênese por meio da adição de 2 mL de soluções contendo L-tirosina 1 mM, L-tirosina 1 mM e NH_4Cl 2,5 ou 5 ou 7,5 ou 10 mM em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina. Como controle, foram utilizadas células com níveis basais de melanina, tratadas com 2 mL de DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h e, a seguir, foi iniciada a extração da melanina. Para tal as células foram desprendidas do poço através da adição de 300 µL de tripsina e, em seguida, centrifugadas a 3000 g por 5 min a 4 °C, lavadas com solução tampão fosfato e centrifugadas novamente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma solução de NaOH 1 M e as células foram submetidas a 3 ciclos de congelamento (2 min) e descongelamento a 37° C (2 min), com 12 minutos de duração total. As amostras foram homogeneizadas em vórtex para completa solubilização da melanina. Sessenta microlitros de cada amostra foram diluídos em 240 µL de água (1:5) para medida da absorbância em 470 nm utilizando espectrofotômetro UV-2401 PC. A quantificação do conteúdo total de proteínas foi realizada pelo método de Bradford na microplaca de 96 poços. Para tal, em cada poço da microplaca foram adicionados 49 µL de água, 1 µL de amostra (melanina extraída das células) e 100 µL do reagente de Bradford e, após 5 minutos, a leitura da absorbância (abs) em 395 nm foi realizada no leitor de microplacas infinit M200 (TECAN). A concentração de proteínas ($\mu g.mL^{-1}$) foi calculada por meio da equação da reta obtida correlacionando os valores de abs da soroalbumina bovina (BSA) obtidos com as concentrações conhecidas de BSA (10, 20, 40, 60 e 80 $\mu g.mL^{-1}$). A seguir, ponderou-se os valores obtidos pelo fator de diluição, perfazendo a concentração proteica em $\mu g.mL^{-1}$. Os experimentos foram realizados em triplicata (3 poços) em 2 corridas independentes (n=6).

Considerou-se uma unidade arbitrária da quantidade de melanina por mg de proteína total segundo a Equação 6:

$$\text{Teor de melanina por mg de proteína} = \frac{\text{Abs melanina}}{\text{Quantidade de proteína } .60} .1000$$

Equação 6

4.2.2.1.3 Determinação da viabilidade celular em diferentes condições de indução de melanogênese

A viabilidade celular das células B16F10 com níveis basais de melanina e após tratamento com diferentes concentrações de NH_4Cl (2,5, 5, 7,5 e 10 mM) e L-tirosina em uma concentração fixa de 1 mM foi avaliada na ausência e na presença de luz VIS (12 J/cm^2).

Foram inoculadas 0,96 x 10^4 células em cada poço da microplaca de 96 poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse período, foi realizada a indução da melanogênese por meio da adição de 200 µL de soluções contendo L-tirosina 1 mM, L-tirosina 1 mM e NH_4Cl 2,5 ou 5 ou 7,5 ou 10 mM em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 UI.mL^{-1} de penicilina e 100 µg.mL^{-1} de estreptomicina. Como controle, foram utilizadas células com níveis basais de melanina, tratadas com 200 µL de DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 UI.mL^{-1} de penicilina e 100 µg.mL^{-1} de estreptomicina. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse período, foram adicionados 100 µL de PBS em cada poço e, a seguir, uma das microplacas foi submetida a 12 J/cm^2 de luz VIS e a outra microplaca foi mantida no escuro e usada como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24h e, a seguir, foram adicionados 100 µL de MTT na concentração de 50 µg.mL^{-1} em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 UI.mL^{-1} de penicilina e 100 µg.mL^{-1} de estreptomicina, e as células foram incubadas por 2 h a 37°C. Após o período de incubação, o excesso de MTT de cada poço foi removido por meio da aspiração do meio de cultura, e foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço.

Após a solubilização do pigmento formazan, foi realizada a leitura de absorbância das soluções resultantes das microplacas, expostas ou não à luz VIS, em 550 nm no leitor de microplacas TECAN Infinite M200, e foi calculada a viabilidade celular relativa. Os experimentos foram realizados em triplicata em três corridas independentes.

4.2.2.1.4 Determinação da dose de luz VIS

A sensibilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina e também após indução da melanogênese por tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina foi avaliada em três doses de luz VIS (12, 24 e 36 J/cm^2), sendo que a dose utilizada no estudo foi de 36J/cm^2, já que nessa dose houve menor variabilidade entre os experimentos, além de resultar em viabilidade celular superior a 90% nas células que não receberam o tratamento para indução de melanogênese.

Para tal foram inoculadas 2,85 x 10^4 células em cada poço da microplaca de 48 poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 37 °C em estufa de CO_2. Após esse procedimento, foi realizada a indução da melanogênese por meio da adição de 300 µL de uma solução contendo NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina. Nos poços controle foram adicionados 300 µL de DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina. As microplacas foram incubadas por 24h a 37 °C em estufa de CO_2. Após esse período, foram adicionados 200 µL de PBS em cada poço e, a seguir, uma das microplacas foi submetida à luz VIS (12, 24 ou 36 J/cm^2) e a outra microplaca foi mantida no escuro e usada como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, viabilidade celular foi obtida como descrito no item 4.2.2.1.3.

4.2.2.1.5 Quantificação da geração de oxigênio singleto

A quantificação de $^1O_2$ foi realizada no instrumento Edinburgh F900, especialmente desenvolvido para medir a emissão resolvida no tempo no infravermelho próximo. Esse equipamento consiste em: um laser de Nd:YAG acoplado a um OPO regulado para excitação em 450 nm (5 ns em 10 Hz , 2 mJ/pulso); suporte de cubeta; filtro de silício; monocromador; fotomultiplicadora resfriada por nitrogênio líquido; e um analisador multicanais rápido com 5ns/canal.

Inicialmente foram inoculadas 2,85 x 10^5 células em cada poço da microplaca de 6 poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse procedimento, foi realizada a indução da melanogênese por meio da adição de 2 mL de solução contendo NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 $UI.mL^{-1}$ de penicilina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina. Como controle, foram utilizadas células com níveis basais de melanina, tratadas com 2 mL de DMEM. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h e, a seguir, foi iniciada a extração da melanina. Para tal as células foram desprendidas do poço através da adição de 300 µL de tripsina e, em seguida, centrifugadas a 3000 g por 5 min a 4°C, lavadas com PBS e centrifugadas novamente. Em seguida, foram adicionados 500 µL de uma solução de NaOD 1 M e as células foram submetidas a 3 ciclos de congelamento (2 min) e descongelamento (2 min), com 12 minutos de duração total. As amostras foram homogeneizadas em vórtex para completa solubilização da melanina. O espectro de geração de $^1O_2$ foi realizado por excitação da amostra em 450 nm imediatamente após sua preparação.

4.2.2.1.6 Determinação da viabilidade celular para avaliar o efeito protetor da apigenina, da crisina e do beta-caroteno frente à luz VIS

Para avaliar o efeito protetor da API, CRI e BTC, a viabilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina, e também após indução da melanogênese por tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina, foi avaliada na ausência e na presença de 36J/cm^2 de luz VIS.

Nesse ensaio foram utilizadas duas microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Foram inoculadas 0,96 x 10^4 células em cada poço da microplaca de 96 poços. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse período, foi realizada a indução da melanogênese por meio da adição de 200 µL de uma solução contendo NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 UI.mL^{-1} de penicilina e 100 µg.mL^{-1} de estreptomicina. Como controle, foram utilizadas células com níveis basais de melanina, tratadas com 200 µL de DMEM. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO_2. Após esse período foram adicionados em quadruplicata, 100 µL de sete diferentes concentrações de cada antioxidante isolado (6,8; 10; 14,7; 21,5; 46,4; 68,1 e 100 µg.mL^{-1}), diluído em DMSO e PBS, nas células com níveis basais de melanina e também nas que receberam o tratamento para indução de melanogênese. Em seguida, uma das microplacas foi submetida à irradiação por luz VIS (36 J/cm^2), para a determinação da fototoxicidade. A outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e usada como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24h e, a seguir, foram adicionados 100 µL do corante MTT na concentração de 50 µg.mL^{-1} em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SBF, 100 UI.mL^{-1} de penicilina e 100 µg.mL^{-1} de estreptomicina, e as células foram incubadas por 2 h a 37 °C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido por meio da aspiração do meio de cultura, e foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço.

Após a extração do corante das células, foi realizada a leitura de absorbância das soluções resultantes das microplacas, expostas ou não à luz VIS, em 550 nm no leitor de microplacas TECAN Infinite M200, e foi calculada a viabilidade celular relativa. Os experimentos foram realizados em triplicata em três corridas independentes.

4.2.2.2 Estudo do efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas a partir da lecitina de soja

A avaliação da proteção de membrana oferecida pela API, CRI e BTC contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas foi baseada no estudo de Bacellar e colaboradores (BACELLAR et al., 2014). Inicialmente foram preparados lipossomas unilamelares através da dissolução de 30 mg de lecitina de soja em clorofórmio e eliminação do solvente por secagem com argônio. Em seguida, o filme seco de lipídeo foi solubilizado em 1 mL de solução de carboxifluoresceína (CF) em tampão Tris, pH 8,0, e essa suspensão foi homogeneizada com auxílio do ultra-som e vórtex por 15 min. Esse procedimento gera uma suspensão de lipossomas contendo CF encapsulada no interior dos lipossomas. A CF não encapsulada foi removida por cromatografia por exclusão em coluna Sephadex G-50 equilibrada em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0. A fração contendo os lipossomas foi identificada visualmente e coletada em um frasco. Uma vez que a concentração de CF é suficientemente elevada para promover a auto-extinção de fluorescência, um aumento na fluorescência da CF indica vazamentos para a solução externa (WEINSTEIN et al., 1977) e pode ser usada para inferir a ocorrência de danos na membrana. Experimentos utilizando espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) confirmaram que os lipossomas preparados por esse método foram unilamelares e as medições de dispersão dinâmica de luz revelaram que seu diâmetro estava na faixa de 150 a 200 nm (BACELLAR et al., 2014). Logo após o preparo da suspensão de lipossomas, a quantificação do dano à membrana foi realizada em microplacas de fluorescência de 96 poços (Greiner Bio One). Para tal, foram adicionados 7 µL da suspensão de lipossomas, 15 µL de dimetil azul de metileno (DMMB) 300 µM, e 279 µL de oito diferentes concentrações de cada antioxidante isolado (concentração final no poço: 6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$), em triplicata, diluído em DMSO e Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0.Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico 30 µM (concentração final no poço). A microplaca foi irradiada com um diodo emissor de luz (LED) vermelho, com comprimento de onda máximo de emissão de 633 nm e 5,32 mW/cm^2 de irradiância, a uma distância de 10 cm da fonte. A fluorescência da CF em 517 nm foi monitorada em função do tempo de irradiação no leitor de microplacas TECAN Infinite M200, com excitação em 480 nm. A medidas foram realizadas a cada 10 min de irradiação, com início no tempo zero (antes da irradiação) até 90 min. Ao final do experimento, 20 µL de uma solução de Triton X-100 foram adicionados em cada poço e, após 10 min de irradiação, a fluorescência foi medida

novamente. Os experimentos foram realizados em triplicata em três corridas independentes. A porcentagem de CF liberada foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$\%\ \text{CF liberada} = 100\,.\frac{I - I_0}{I_T - I_0}$$

Equação 7

Onde: *I:* intensidade de fluorescência medida

I_0*:* intensidade de fluorescência inicial

I_T*:* intensidade de fluorescência após adição de Triton X-100

5 Resultados

5.1 Estudo para avaliação da segurança da apigenina, crisina e beta-caroteno frente à radiação UVA/VIS e luz VIS

5.1.1 Desenvolvimento de validação do método de Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

Os estudos de validação do método de CLAE foram realizados com o objetivo de obter um método que permitisse a análise simultânea da API, CRI e BTC com seletividade, linearidade, LD, LIQ, precisão e exatidão aceitáveis.

Para desenvolver o método de CLAE, diversas fases móveis com diferentes proporções de água acidificada com 2% de ácido acético, metanol e isopropanol, bem como diferentes gradientes, foram estudados. Após avaliar as separações cromatográficas obtidas após várias análises por CLAE, o método que proporcionou a melhor resolução dos picos das três substâncias em estudo foi eluição por gradiente, iniciando com eluição constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (55:13,5:31,5, v/v) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 4 minutos, o qual foi mantido com eluição constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (0:30:70, v/v) por 13 minutos. Assim, esse foi o método cromatográfico utilizado nas análises dos filtros solares e antioxidantes estudados.

A API, CRI e BTC foram adequadamente separados utilizando as condições cromatográficas mencionadas acima e apresentaram tempos de retenção de aproximadamente 4,6, 8,1 e 17,8 min, respectivamente (Fig. 11). De acordo com a Fig. 11, o método se mostrou seletivo para as substâncias analisadas e não foram observados picos interferentes nos tempos de retenção dessas substâncias.

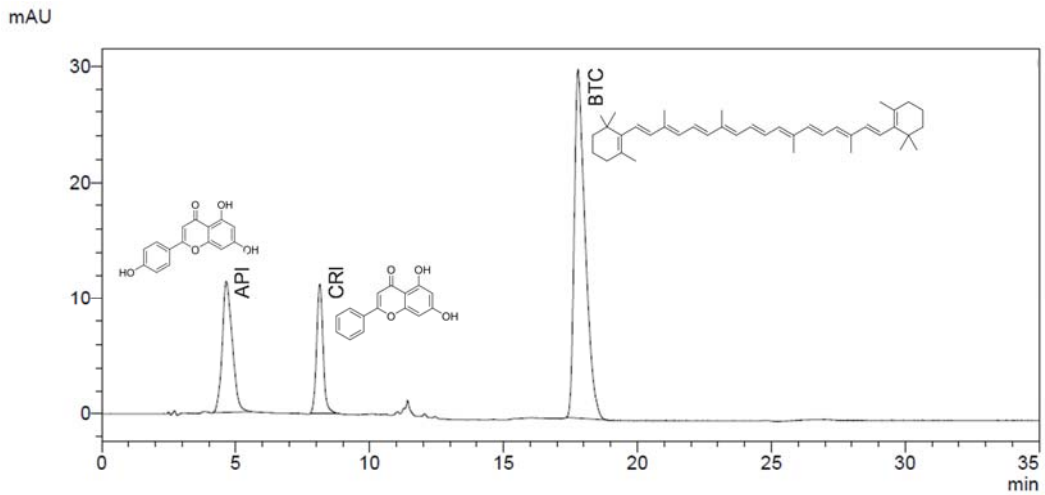


Figura 11 – Perfil cromatográfico dos padrões (2.5 µg.mL^{-1}) em tetrahidrofurano:isopropanol (30:70). Picos: apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC). Condições cromatográficas: eluição por gradiente com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol; fluxo: 0,8 mL.min^{-1}; coluna de fase reversa C18, (5µm), 250mm×4mm; detecção em 325 nm (API, CRI) e 454nm (BTC).

As áreas dos picos da API, da CRI e do BTC foram medidas e plotadas contra sua concentração (x) após análise por CLAE. Todas as substâncias apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 e o método se mostrou linear na faixa de concentração de 2,5 a 40 $\mu g.mL^{-1}$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Linearidade de apigenina, crisina e beta-caroteno em solução de tetrahidrofurano:isopropanol (30:70).

Antioxidante	**Faixa linear ($\mu g.mL^{-1}$)**	**Equação de regressão**	**Coeficiente de correlação (*r*)**
Apigenina	2,5 – 40,0	Y= 118270,49x - 11969,32	r = 0,99961
Crisina	2,5 – 40,0	Y= 76164,02x - 1286,46	r = 0,99967
Beta-caroteno	2,5 – 40,0	Y= 378702,38x - 16432,00	r = 0,99943

Y: área do pico; X: concentração da substância ($\mu g.mL^{-1}$).

O valores encontrados para o LD foram de 0,73, 0,67 e 0,82 $\mu g.mL^{-1}$, para a API, a CRI e o BTC, respectivamente. Com relação ao LIQ, foram encontrados valores iguais a 2,22, 2,02 e 2,48 $\mu g.mL^{-1}$, para a API, a CRI e o BTC, respectivamente.

O método foi considerado preciso com valores de DPR% intra- e inter-ensaio inferiores a 6,22 e 6,85, respectivamente, para os antioxidantes estudados (Tabela 2). Os valores de exatidão intra- e inter-ensaio da API, CRI e BTC ficaram entre 85,64% e 96,80% (Tabela 2).

Tabela 2 – Precisão e exatidão intra- e inter-ensaio da apigenina, crisina e beta-caroteno em tetrahidrofurano:isopropanol (30:70) .

Antioxidante	Intra-ensaio (n=3)			Inter-ensaio (n=9)		
	Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	**DPR (%)**	**E (%)**	**Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)**	**DPR (%)**	**E (%)**
Apigenina						
2,5 $\mu g.mL^{-1}$	2,14	4,03	85,64	2,16	3,01	86,59
10,0 $\mu g.mL^{-1}$	8,69	2,53	86,87	8,78	2,97	87,79
40,0 $\mu g.mL^{-1}$	35,00	1,92	87,49	36,12	5,00	90,30
Crisina						
2,5 $\mu g.mL^{-1}$	2,21	4,14	88,36	2,22	3,17	88,79
10,0 $\mu g.mL^{-1}$	9,22	2,58	92,16	9,31	2,94	93,05
40,0 $\mu g.mL^{-1}$	37,55	4,58	93,88	38,72	4,93	96,80
Beta-caroteno						
2,5 $\mu g.mL^{-1}$	2,19	5,63	87,68	2,19	6,51	87,55
10,0 $\mu g.mL^{-1}$	9,40	0,16	94,03	8,89	4,93	88,91
40,0 $\mu g.mL^{-1}$	38,30	6,22	95,75	35,83	6,85	89,57

DPR: Desvio Padrão Relativo; E: Exatidão.

5.1.2 Estudo de fotoestabilidade

As concentrações dos antioxidantes em estudo, na ausência e na presença de radiação, e os seus respectivos valores de concentração remanescente, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. A porcentagem de recuperação dos antioxidantes após irradiação por UVA/VIS ou VIS está representada na forma de gráfico (Fig. 12).

Tabela 3 – Porcentagem de recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) isolados ou em combinação (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (275 KJ/m^2) / VIS (1080 KJ/m^2).

Antioxidante	**Concentração teórica (µg.mL^{-1})**	**Concentração na formulação não irradiada (µg.mL^{-1})**	**Concentração na formulação irradiada (µg.mL^{-1})**	**Concentração remanescente (%)**	**Concentração remanescente média (%)**
		13,9	14,3	102,9	
Apigenina	16,0	14,7	14,2	96,4	99,0
		14,0	13,7	97,8	
		13,4	14,0	103,9	
Apigenina na combinação	16,0	14,1	14,1	100,1	101,5
		14,0	14,1	100,5	
		15,1	14,4	95,4	
Crisina	16,0	15,4	14,6	95,2	97,4
		15,0	15,2	101,6	
		14,0	14,5	103,4	
Crisina na combinação	16,0	14,7	14,7	100,0	101,1
		14,6	14,6	100,0	
		14,9	13,9	93,1	
Beta-caroteno	16,0	15,4	12,7	82,8	88,2
		14,6	12,9	88,7	
		14,6	13,7	93,9	
Beta-caroteno na combinação	16,0	15,0	13,7	91,7	92,2
		15,2	13,8	91,0	

Tabela 4 – Porcentagem de recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) isolados ou em combinação (API+CRI+BTC) após exposição à luz VIS (1080 KJ/m^2).

Antioxidante	Concentração teórica (µg.mL^{-1})	Concentração na formulação não irradiada (µg.mL^{-1})	Concentração na formulação irradiada (µg.mL^{-1})	Concentração remanescente (%)	Concentração remanescente média (%)
		14,6	14,2	97,3	
Apigenina	16,0	14,4	13,7	94,6	98,5
		13,8	14,3	103,6	
		13,6	11,1	81,3	
Apigenina na combinação	16,0	13,0	14,4	110,7	100,8
		12,1	13,3	110,4	
		15,0	14,1	93,9	
Crisina	16,0	15,2	14,4	94,5	96,7
		14,9	15,2	101,7	
		14,2	11,5	81,0	
Crisina na combinação	16,0	13,6	15,1	110,6	100,6
		12,6	13,9	110,0	
		14,2	15,4	108,7	
Beta-caroteno	16,0	15,4	15,0	96,9	100,0
		15,7	14,9	94,5	
		14,9	12,5	84,1	
Beta-caroteno na combinação	16,0	15,4	16,9	109,8	100,5
		13,1	14,1	107,5	

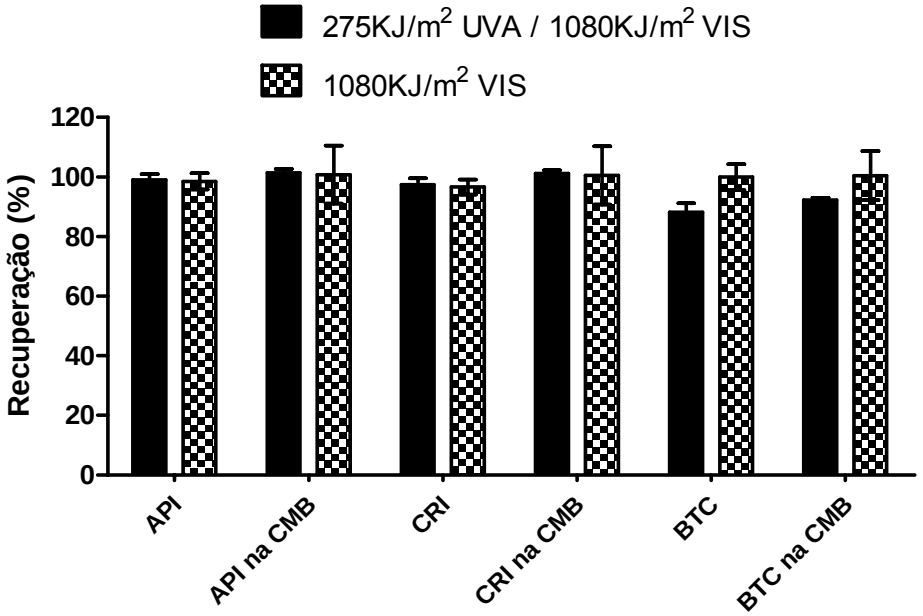


Figura 12 – Recuperação da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC), isolados e em combinação (CMB = API+CRI+BTC) após exposição à UVA (275 KJ/m^2) / VIS (1080KJ/m^2) ou VIS (1080 KJ/m^2). ANOVA, Média ± E.P.M.

A fotoestabilidade da API, CRI e BTC, isolados ou em combinação (API+CRI+BTC), foi avaliada com base na recuperação de cada substância após irradiação por UVA/VIS ou VIS. A análise estatística dos valores de concentração dos antioxidantes, presentes nas amostras irradiadas e não irradiadas, e de porcentagem de recuperação pelo teste paramétrico ANOVA mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos. Após análise estatística, foi observado que os antioxidantes estudados (API, CRI e BTC), tanto isoladamente, quanto em combinação, foram fotoestáveis frente à radiação UVA/VIS e VIS, uma vez que, não houve diferença estatística entre as amostras irradiadas e não irradiadas. Além disso, a API e a CRI, isoladas ou na combinação exibiram valores de recuperação em torno de 100% em ambas a faixas de radiação avaliadas (Fig. 12). Entretanto, embora não tenha sido observada diferença estatística entre as amostras irradiadas e não irradiadas, na presença da radiação UVA/VIS o BTC apresentou degradação em torno de 12% quando usado isoladamente, e de 8% quando associado à API e CRI (Fig. 12).

5.1.3 Estudo de fotorreatividade

A fotoexcitabilidade da API, da CRI e do BTC, foi estimada pelo monitoramento da geração de $O_2^{-\bullet}$ e $^1O_2$ após exposição ao UVA/VIS ou VIS com o objetivo de predizer seu potencial fototóxico. Na presença da radiação UVA/VIS, a API, a CRI e combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) se mostraram fracamente fotorreativas devido à habilidade em gerar $O_2^{-\bullet}$ (SA≥20) (Tabela 5). Entretanto, nenhum dos compostos apresentou fotorreatividade após exposição à luz VIS.

Tabela 5 – Geração de oxigênio singleto ($^1O_2$, SO) e ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$, SA) a partir da apigenina (API), da crisina (CRI), do beta-caroteno (BTC) e da sua combinação (CMB = API+CRI+BTC) após exposição à UVA (57 J/cm^2) / VIS (245 J/cm^2) ou VIS (245 J/cm^2).

Composto teste	**Corrida**	**UVA/VIS**		**VIS**	
		$^1O_2$ (SO)	**$^{\bullet}O_2^{-}$ (SA)**	**$^1O_2$ (SO)**	**$^{\bullet}O_2^{-}$ (SA)**
		($\Delta A_{440nm} \times 10^3$)	**($\Delta A_{560nm} \times 10^3$)**	**($\Delta A_{440nm} \times 10^3$)**	**($\Delta A_{560nm} \times 10^3$)**
API[a]	1	-22	**26**	-2	1
	2	-8	**26**	0	2
CRI[a]	1	-9	**55**	-1	5
	2	-4	**57**	1	5
BTC[a]	1	-2	-1	14	-2
	2	-6	11	9	-3
CMB[b]	1	21	**37**	24	1
	2	11	**46**	20	2
Quinina (Controle positivo na faixa do UVA/VIS)[c]	1	567	182	-	-
	2	447	274	-	-
Norfloxacino (Controle positivo na faixa do UVA/VIS)[c]	1	149	132	-	-
	2	132	127	-	-
Salicilato de octila (Controle negativo)[a]	1	6	5	6	-3
	2	3	10	6	-3
L-Histidina (Controle negativo)[c]	1	6	-7	-	-
	2	-15	-1	-	-

[a] Composto testado a 20 µM em NaPB 20 mM.
[b] Combinação testada a 10 µM (API e CRI) e 20µM (BTC) em NaPB 20 mM.
[c] Composto testado a 200 µM em NaPB 20 mM.
Números em negrito foram considerados fotorreativos a SA na faixa UVA/VIS, de acordo com JaCVAM, 2013a.

5.1.4 Estudo de fototoxicidade

O potencial fototóxico dos antioxidantes induzido por excitação pela luz foi avaliado pelo teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. O estudo de fototoxicidade da API, CRI e BTC, bem como da sua combinação, foi conduzido utilizando cultura de fibroblastos (Balb/3T3 clone A31), de melanócitos (Melan-a) e de melanoma (B16F10). Previamente ao início dos estudos de fototoxicidade, foi realizada a determinação da sensibilidade das células à radiação UVA/VIS e VIS.

Os resultados do ensaio para a determinação da sensibilidade das linhagens celulares utilizadas no estudo de fototoxicidade estão apresentados nas Figuras 13 e 14. A dose de radiação utilizada no estudo de fototoxicidade está dentro dos critérios de aceitação determinados no estudo de validação, ou seja, uma viabilidade celular de no mínimo 80% frente a 9 J/cm^2 de UVA (Fig. 13). A dose de radiação utilizada no estudo de fototoxicidade ao VIS (40J/cm^2) corresponde ao tempo de exposição equivalente a 9J/cm^2 de UVA, e ainda está dentro dos critérios de aceitação determinados no estudo de validação, uma vez que utilizando essa dose foi observada viabilidade celular acima de 80% (Fig. 14).

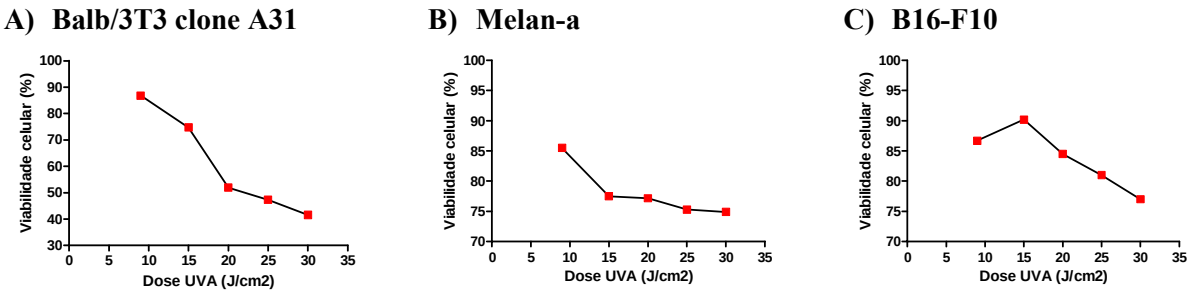


Figura 13 – Viabilidade celular em diferentes doses de radiação UVA/VIS (9/40, 15/70, 20/90, 25/110 e 30/130 J/cm^2) das linhagens: **A)** Balb/3T3 clone A31; **B)** Melan-a; **C)** B16F10.

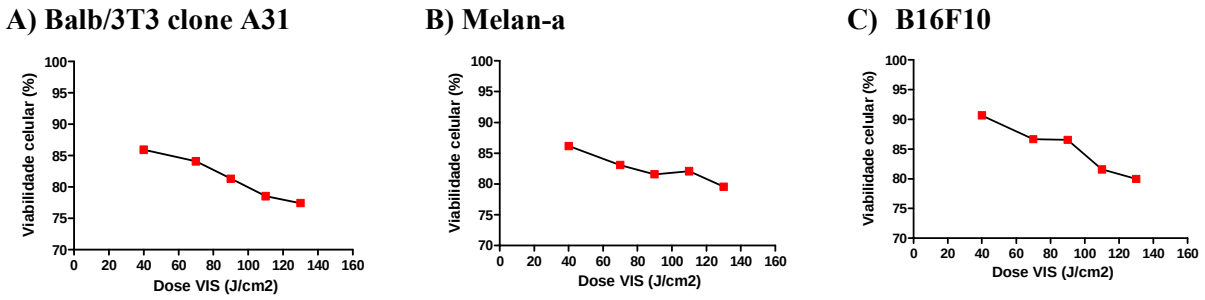


Figura 14 – Viabilidade celular em diferentes doses de luz VIS (40, 70, 90, 110 e 130 J/cm^2) das linhagens: **A)** Balb/3T3 clone A31; **B)** Melan-a; **C)** B16F10.

A Tabela 6 resume os resultados para as três linhagens celulares nas duas faixas de radiação (UVA/VIS e VIS). Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os valores de PIF e MPE obtidos para a API, CRI, BTC e sua combinação na presença de UVA/VIS e VIS. As Figuras 15 e 16 ilustram a curva dose resposta das substâncias isoladas e também da sua combinação nas linhagens celulares avaliadas após exposição à radiação UVA/VIS e VIS.

Tabela 6 – Potencial fototóxico da apigenina (API), crisina (CRI) e beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2) ou VIS (40 J/cm^2) em diferentes linhagens celulares.

Substância	**UVA/VIS**			**VIS**		
	Balb/3T3 clone A31	**Melan-a**	**B16-F10**	**Balb/3T3 clone A31**	**Melan-a**	**B16-F10**
Apigenina	NF	F	F	NF	F	NF
Crisina	F	F	F	NF	NF	F
Beta-caroteno	F	F	F	F	F	NF
Combinação	F	PF	F	F	NF	F
Norfloxacino	F	F	F	-	-	-
Histidina	NF	-	-	-	-	-
Protoporfirina	-	-	-	F	F	F

F: fototóxico; NF: não fototóxico, PF: provavelmente fototóxico.

Tabela 7 – Fototoxicidade da apigenina (API), crisina (CRI), beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2).

Substância	**Corrida**	**Balb/3T3 clone A31**		**Melan-a**		**B16-F10**	
		PIF	**MPE**	**PIF**	**MPE**	**PIF**	**MPE**
Apigenina	1	1,000	0,015	1,619	0,457 [a]	1,455	0,307 [a]
	2	1,000	0,097	6,111	0,977 [a]	1,000	0,528 [a]
Crisina	1	4,092	0,511[a]	3,750	0,423 [a]	28,917	0,659 [a]
	2	2,819	0,536[a]	5,103	0,576 [a]	1,000	0,553 [a]
Beta-caroteno	1	24,536	0,840[a]	1,155	0,365 [a]	1,441	0,238 [a]
	2	11,874	0,741[a]	1,783	0,363 [a]	1,048	0,944 [a]
Combinação	1	19,63	0,415[a]	5,101	0,137 [b]	13,465	0,571 [a]
	2	10,864	0,440[a]	6,344	0,332 [a]	29,249	0,227 [a]
L-Histidina (controle -)	1	1,000	0,063	-	-	-	-
Norfloxacino (controle +)	1	2,027	0,468[a]	1,209	0,256 [a]	3,638	0,421 [a]

[a] Fototóxico; [b] Provavelmente fototóxico (de acordo com OECD, 2004).

Tabela 8 – Fototoxicidade da apigenina (API), crisina (CRI), beta-caroteno (BTC) e da combinação dos antioxidantes (API+CRI+BTC) após exposição à luz VIS (40 J/cm^2).

Substância	**Corrida**	**Balb/3T3 clone A31**		**Melan-a**		**B16-F10**	
		PIF	**MPE**	**PIF**	**MPE**	**PIF**	**MPE**
Apigenina	1	1,000	-0,134	1,000	0,344 [a]	1,000	0,032
	2	1,000	0,083	1,000	0,374 [a]	1,000	0,067
Crisina	1	1,000	0,035	1,000	-0,090	1,001	0,281 [a]
	2	1,000	0,019	1,000	0,060	1,000	0,635 [a]
Beta-caroteno	1	1,987	0,110[b]	1,000	0,114 [b]	1,000	-0,092
	2	1,885	0,203[a]	1,000	0,181 [a]	1,000	0,046
Combinação	1	2,608	0,315[a]	1,978	0,054	2,538	0,331 [a]
	2	2,073	0,334[a]	1,448	0,098	37,514	0,340 [a]
Norfloxacino (controle -)	1	1,000	0,005	-	-	-	-
Protoporfirina (controle +)	1	72,296	0,630[a]	17,769	0,232 [a]	111,685	0,819 [a]

[a] Fototóxico; [b] Provavelmente fototóxico (de acordo com OECD, 2004).

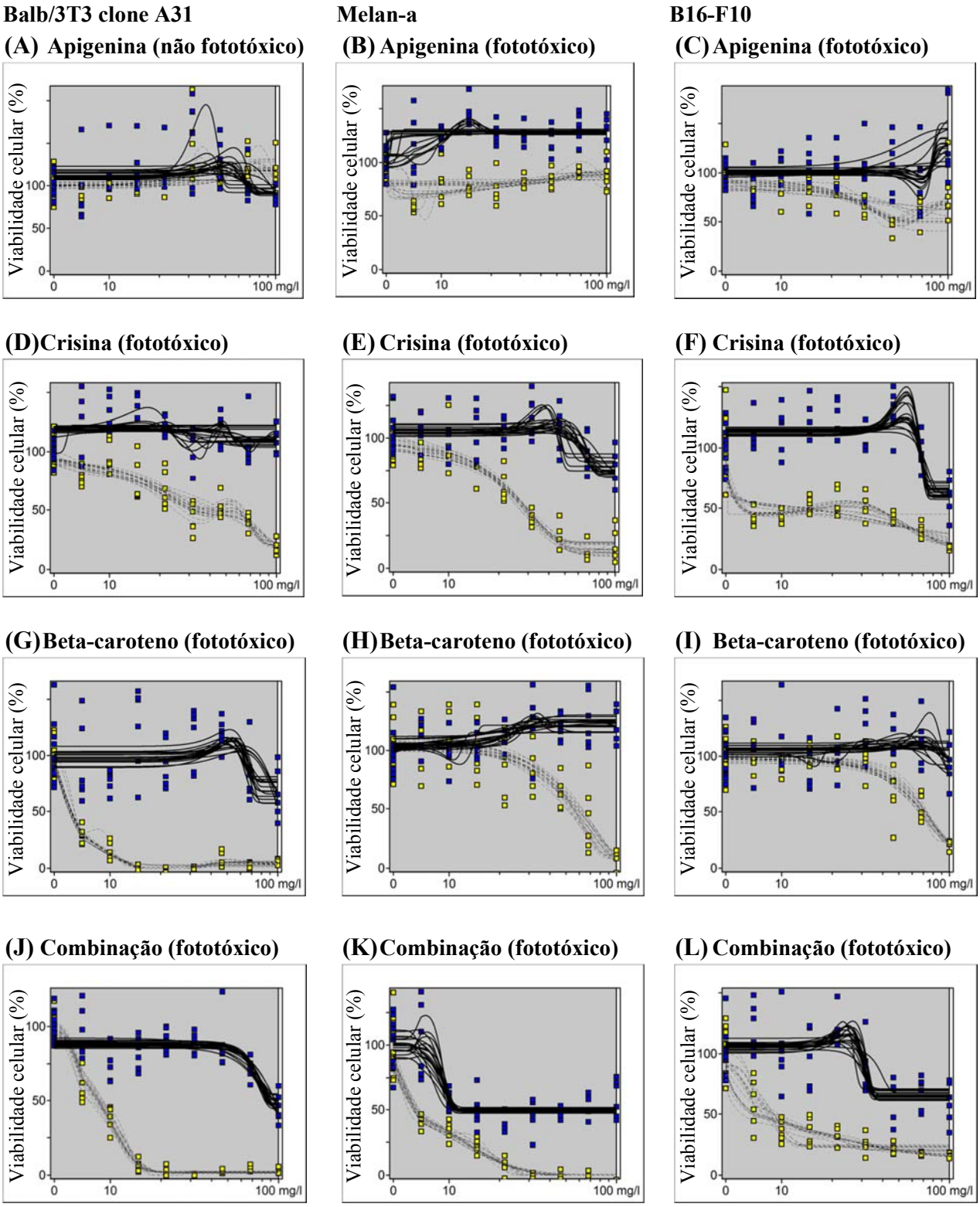


Figura 15 – Curva dose resposta dos antioxidantes isolados e em combinação (apigenina+crisina+beta-caroteno) obtidas através do Software Phototox 2.0 em cultura de fibroblastos Balb/3T3 clone A31 **(A, D, G e J)**, melanócitos Melan-a **(B, E, H e K)** e melanoma B16F10 **(C, F, I e L)** na ausência e presença de UVA (9 J/cm^2) / VIS (40 J/cm^2). Os pontos azuis e amarelos referem-se, respectivamente às células não irradiadas (-UVA/VIS) e irradiadas (+UVA/VIS).

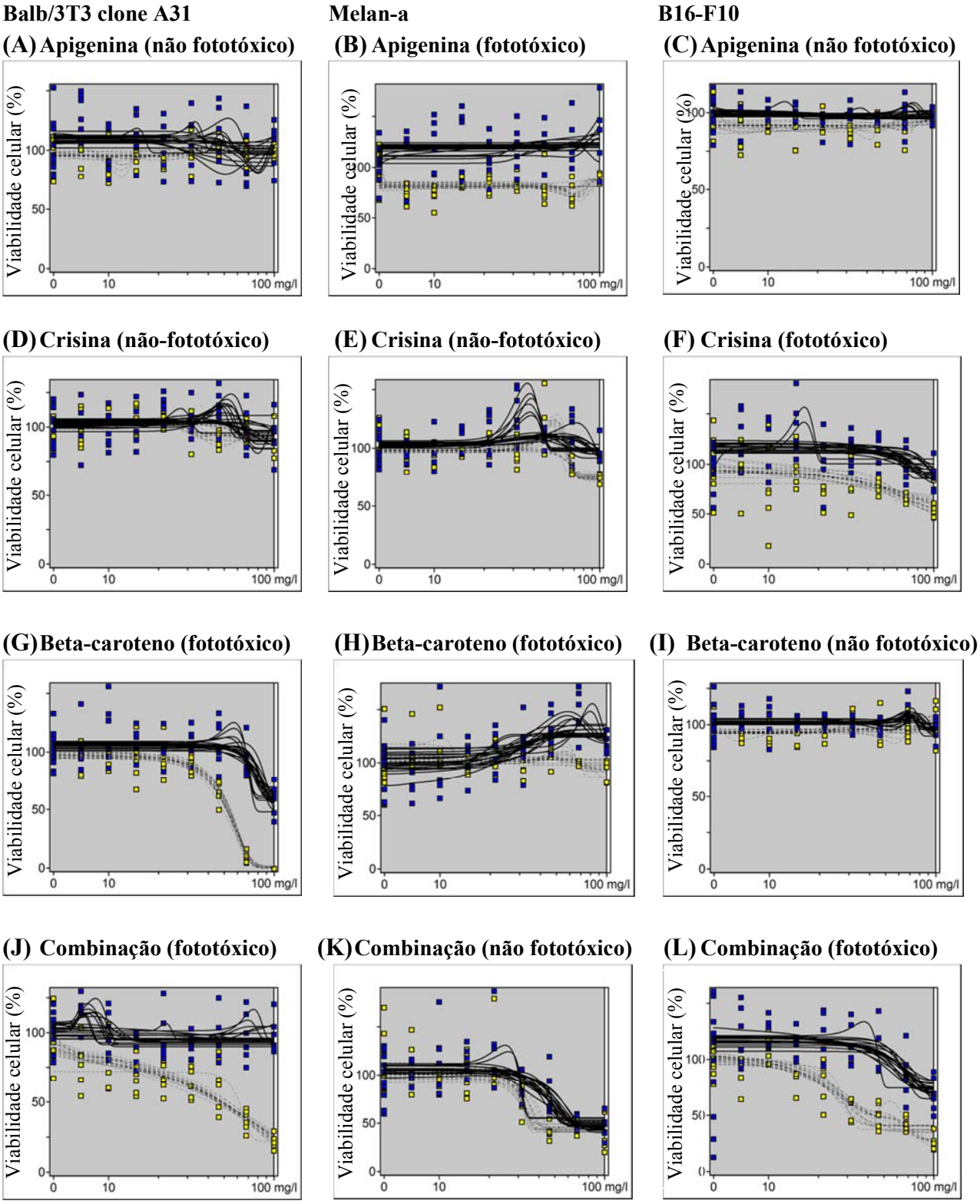


Figura 16 – Curva dose resposta dos antioxidantes isolados e em combinação (apigenina+crisina+beta-caroteno) obtidas através do Software Phototox 2.0 em cultura de fibroblastos Balb/3T3 clone A31 **(A, D, G e J)**, melanócitos Melan-a **(B, E, H e K)** e melanoma B16F10 **(C, F, I e L)** na ausência e presença de VIS (40 J/cm^2). Os pontos azuis e amarelos referem-se, respectivamente às células não irradiadas (-VIS) e irradiadas (+VIS).

O protocolo estabelecido pela OECD para identificação do potencial fototóxico de uma substância determina a utilização da linhagem de fibroblasto Balb 3T3 clone A31. No ensaio utilizando os fibroblastos, a CRI, o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico (MPE > 0,15) na presença de UVA/VIS (Tabela 7). No entanto, após excitação por luz VIS, foi observado potencial fototóxico apenas para o BTC e a CMB (MPE > 0,15) (Tabela 8).

Nos melanócitos normais (Melan-a) e nas células de melanoma (B16F10), foi observada fototoxicidade para todos os antioxidantes e a CMB, na faixa do UVA/VIS (MPE > 0,15) (Tabela 7), ou seja, as duas linhagens celulares exibiram a mesma resposta nessas condições. Entretanto, foi observada diferença na resposta à exposição à luz VIS entre as células Melan-a e B16F10; nas células Melan-a a API e o BTC exibiram potencial fototóxico (MPE > 0,5), enquanto que na linhagem B16F10 foi observado potencial fototóxico para a CRI e a CMB (Tabela 8).

5.2 Avaliação da eficácia da apigenina, da crisina e do beta-caroteno na proteção contra os danos induzidos pela luz VIS

5.2.1 Estudo de proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10

5.2.1.1 Quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese

A quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese foi realizada com o intuito de definir a condição que proporcionasse um aumento significativo na síntese de melanina pelas células B16F10. A quantidade de melanina produzida em resposta aos diferentes tratamentos para indução de melanogênese aos quais as células foram submetidas está representada na Figura 17.

O tratamento das células B16F10 com Tirosina 1mM e NH_4Cl 2,5 mM resultou em um aumento significativo ($p < 0,001$) do conteúdo de melanina, de cerca de 16 vezes em relação ao controle (Fig. 17). O tratamento das células com Tirosina 1mM e concentrações crescentes de NH_4Cl equivalentes a 5, 7,5 e 10 mM, levou a um aumento da síntese de melanina de em média 28, 36 e 33 vezes, respectivamente, em relação ao controle (Fig. 17).

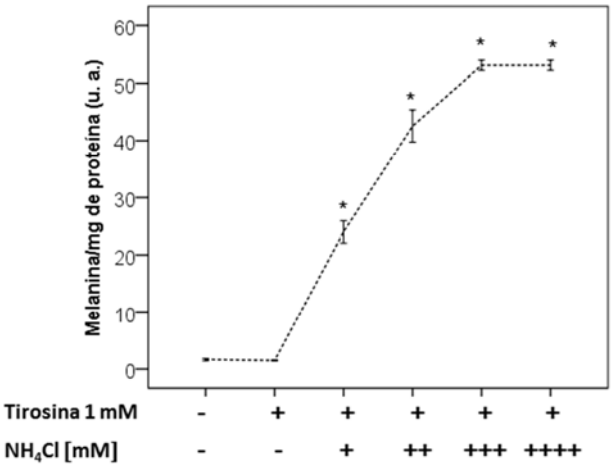


Figura 17 – Conteúdo de melanina obtido após indução da melanogênese das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++). ANOVA, Média ± E.P.M., $p < 0,001$. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl.

5.2.1.2 Determinação da viabilidade celular em diferentes condições de indução de melanogênese

A viabilidade celular das células B16F10 com níveis basais de melanina e após tratamento com diferentes concentrações de NH_4Cl (2,5, 5, 7,5 e 10 mM) e L-tirosina 1 mM, na ausência e na presença de 12 J/cm^2 luz VIS está representada na Figura 18.

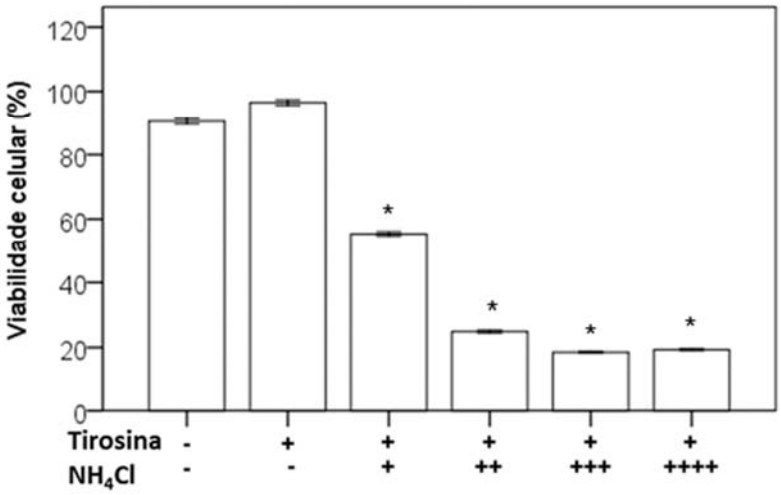


Figura 18 – Viabilidade das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++). A viabilidade celular foi medida após irradiação com 12 J/cm^2 de luz VIS. ANOVA, Média ± E.P.M, $p < 0,0001$. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl.

Ao correlacionar os resultados do estudo de quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese com os resultados obtidos após a determinação da viabilidade celular nessas mesmas condições, foi observado que o aumento gradual da síntese de melanina tem relação direta com a morte celular na presença de luz VIS (Figura 19). Além disso, o tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas foi o que resultou em um aumento significativo da síntese de melanina e em maior viabilidade celular (> 55%) após irradiação pela luz VIS (Figura 18). Assim, o tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina foi considerado a melhor condição para indução de melanogênese seguida por irradiação, e foi utilizado nos estudos posteriores para quantificar a geração de oxigênio singleto e determinar a viabilidade celular para avaliar o efeito protetor da API, da CRI e do BTC.

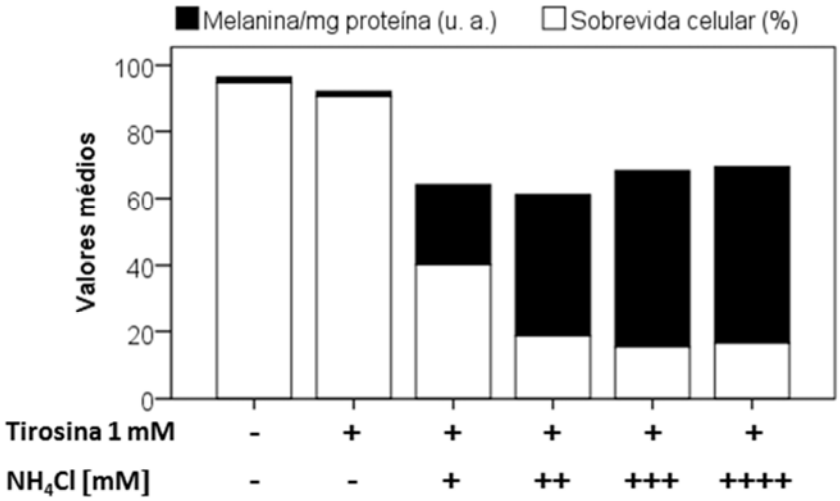


Figura 19 – Correlação entre a quantidade arbitrária de melanina (vide Figura 17) e a viabilidade das células B16F10 tratadas por 24h com L-tirosina 1 mM em presença ou não de diferentes concentrações de NH_4Cl: 2,5 (+), 5 (++), 7,5 (+++) e 10 mM (++++) em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl, após irradiação com 12 J/cm^2 de luz VIS.

5.2.1.3 Determinação da dose de luz VIS

O resultado do ensaio para a determinação da sensibilidade das células B16F10, tratadas com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas, após exposição a três doses de luz VIS (12, 24 e 36 J/cm^2), está apresentado na Figura 20. A dose de radiação utilizada nos estudos posteriores para avaliação da viabilidade celular foi de 36 J/cm^2, uma vez que nessa dose foi observada a menor variabilidade entre os experimentos, e ainda pelo fato da viabilidade celular ter sido superior a 90% nas células que não receberam o tratamento para indução de melanogênese. As células tratadas com NH_4Cl e L-tirosina apresentaram viabilidade média de 65% após exposição a 36 J/cm^2 de luz VIS.

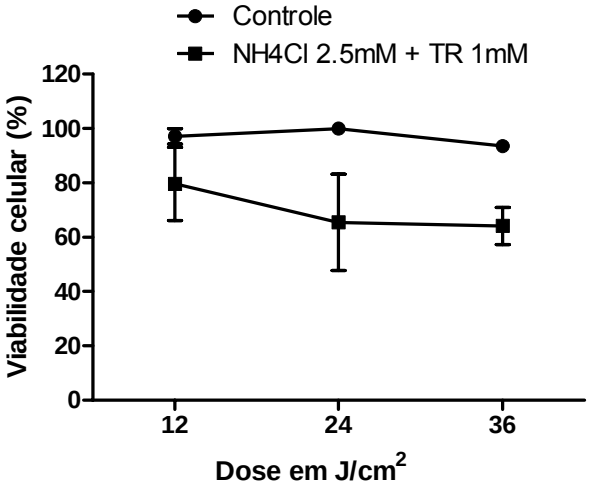


Figura 20 – Viabilidade das células B16F10, tratadas com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas, após irradiação com diferentes doses de luz VIS (12, 24 e 36 J/cm^2).

5.2.1.4 Quantificação da geração de oxigênio singleto

A quantificação de $^1O_2$ foi realizada através da excitação com luz VIS (450 nm) de células com nível basal de melanina (controle) e de células tratadas com NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM, e os espectros de emissão de $^1O_2$ foram registrados na região do infravermelho próximo (Fig. 21A). As células controle apresentaram sinal basal de emissão de $^1O_2$, enquanto as que receberam tratamento para indução de melanogênese exibiram um espectro de emissão que evidenciou a geração de $^1O_2$ (Fig. 21).

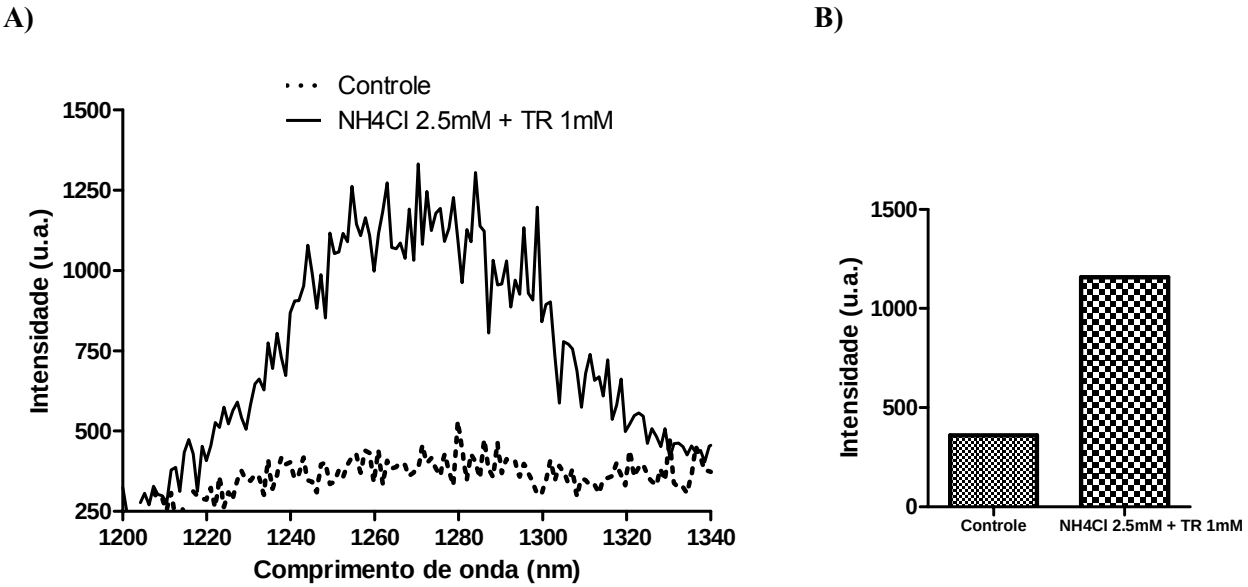


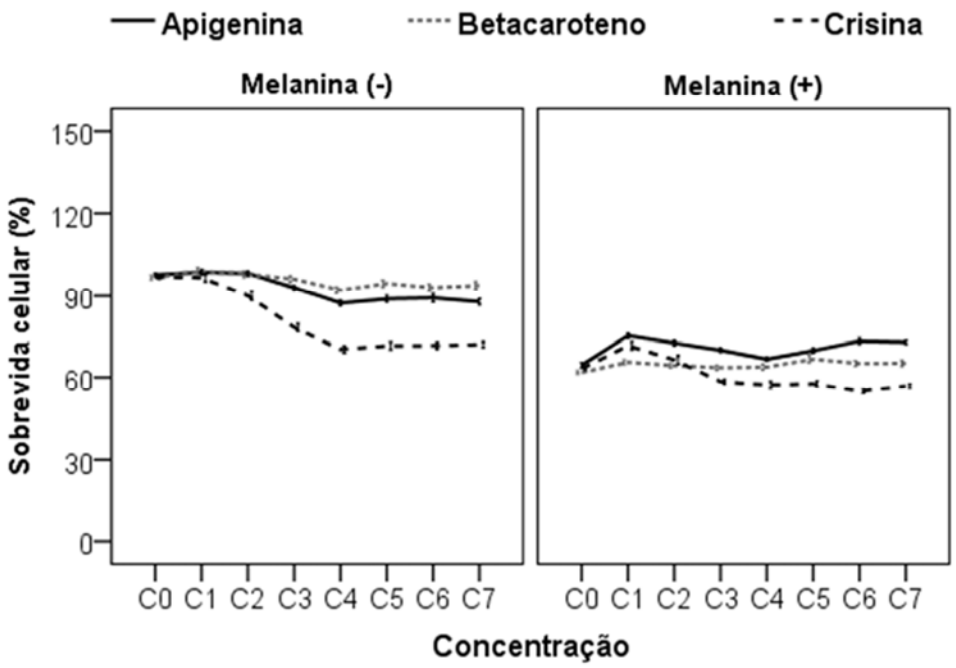
Figura 21 – Geração de oxigênio singleto ($^1O_2$) a partir da melanina extraída das células B16F10, tratadas com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas, após excitação com luz VIS em 450 nm, em relação ao controle sem L-tirosina e NH_4Cl : **A)** Espectro de emissão de $^1O_2$ na faixa de 1200 a 1340 nm; **B)** Intensidade de emissão de $^1O_2$ em 1275 nm.

5.2.1.5 Determinação da viabilidade celular para avaliar o efeito protetor da apigenina, crisina e beta-caroteno

A viabilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina e também após indução da melanogênese por tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina, foi avaliada após exposição a 36 J/cm^2 de luz VIS para verificar o efeito protetor da API, CRI e BTC e está representada na Fig. 22. As células com níveis basais de melanina apresentaram redução da sobrevida na presença da API a partir de 14,7 µg.mL^{-1} ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Já para a CRI foi observada significativa e acentuada redução da sobrevida a partir de 10 µg.mL^{-1} ($p < 0,0001$) (Fig. 22B). No entanto, não se observou nenhum efeito citotóxico para o BTC após irradiação (Fig. 22B).

Nas células que receberam tratamento para indução de melanogênese e foram irradiadas na presença da API houve supressão significativa do efeito fototóxico da luz VIS em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$) (Fig. 22B). Em sua menor concentração C1 (6,8 µg.mL^{-1}), a API promoveu uma fotoproteção significativa em torno de 16 % em comparação ao controle ($p < 0,05$). A CRI conferiu proteção às células apenas quando utilizada na concentração de 6,8 µg.mL^{-1} ($p < 0,05$), uma vez que foi observada redução na viabilidade celular nas concentrações 14,7, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL^{-1}, em relação ao controle (Fig. 22B). Em relação ao BTC, foi observado aumento da sobrevida celular após irradiação por luz VIS quando as células foram tratadas usando as concentrações 6,8, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL^{-1} ($p < 0,05$) (Fig. 22B). De forma geral, a API promoveu maior fotoproteção celular quando comparada à CRI e ao BTC.

A)



B)

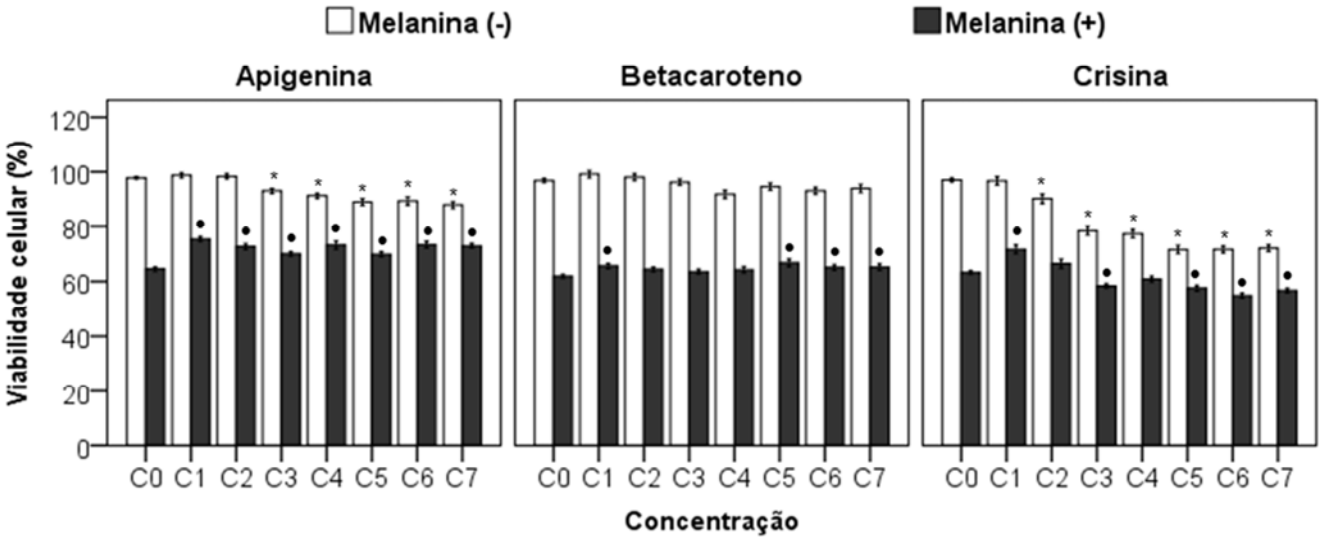


Figura 22 – Viabilidade das células B16F10 com nível basal de melanina (-) e que receberam tratamento para indução de melanogênese com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina (+), após irradiação com 36 J/cm^2 de luz VIS na ausência (C0) e na presença de diferentes concentrações (C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7 equivalentes a, respectivamente, 6,8, 10, 14,7, 21,5, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL^{-1}) de apigenina, crisina e beta-caroteno: **A)** As linhas representam a Média ± E.P.M.; **B)** As barras verticais representam a Média ± E.P.M., ANOVA, os símbolos representam diferença estatística em relação ao controle com nível basal de melanina (*: $p < 0,0001$) e que receberam tratamento para indução da melanogênese (•: $p < 0,05$).

5.2.2 Estudo do efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno na proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas a partir da lecitina de soja

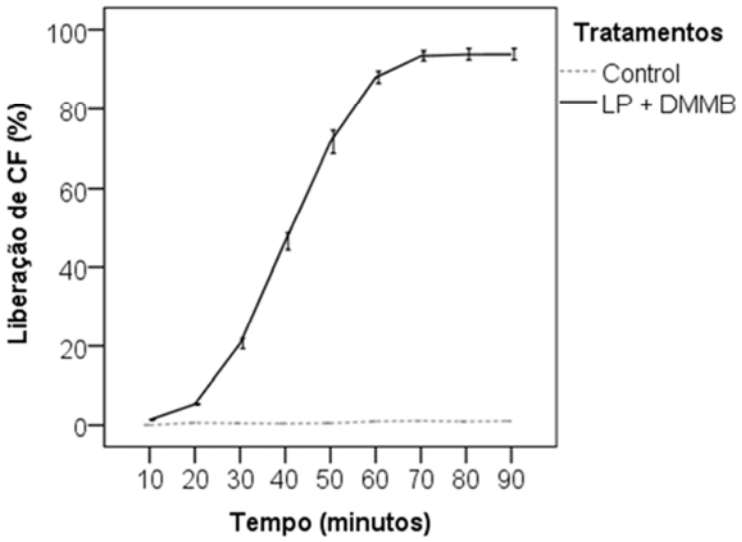
A avaliação da proteção de membrana oferecida pela API, CRI e BTC contra os danos fotoinduzidos pela luz VIS foi realizada em modelo mimético de membrana usando lipossomas. A Fig. 23 mostra a cinética da porcentagem de dano causado pelo DMMB através do aumento da intensidade de fluorescência devido à liberação de CF. Pode-se observar que a partir de 60 min de irradiação atingiu-se um platô, onde não há alteração significativa da fluorescência de CF liberada após o fotodano (Fig. 23A). A proteção conferida pelo ácido gálico (controle positivo) contra os danos fotoinduzidos ocasionados pelo DMMB está apresentada na Figura 23B.

A Fig. 24 mostra o efeito da API, da CRI e do BTC sob os danos à membrana causados pela fotoativação do DMMB. Nota-se que, de 40 a 60 minutos de irradiação, o padrão de liberação de CF se manteve praticamente constante considerando o tratamento com diferentes concentrações de API, CRI e BTC (Fig. 24A).

Para se avaliar as diferenças estatísticas no dano fotoinduzido promovido pelo DMMB em membranas segundo o tratamento com os antioxidantes, considerou-se o tempo de irradiação de 40 minutos. Segundo essas análises, a API foi capaz de proteger eficiente e significativamente a membrana contra os danos fotoinduzidos provocados pelo DMMB em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,0001$) (Fig. 24B). Entretanto, a CRI e o BTC não conferiram proteção, uma vez que houve danos significativos à membrana (Fig. 24B).

A Fig. 25 representa o efeito da API, da CRI e do BTC na porcentagem de dano causado pelo DMMB em relação ao tratamento com ácido gálico (controle positivo). O ácido gálico e a API (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) foram capazes de proteger eficientemente (em torno de 75-79%) e com significância estatística ($p < 0,0001$) a membrana contra os danos fotoinduzidos pela luz VIS, visto que foi registrada uma porcentagem de liberação de CF de, em média 10 e 12%, respectivamente, ao final de 40 minutos de irradiação (Fig. 25).

A)



B)

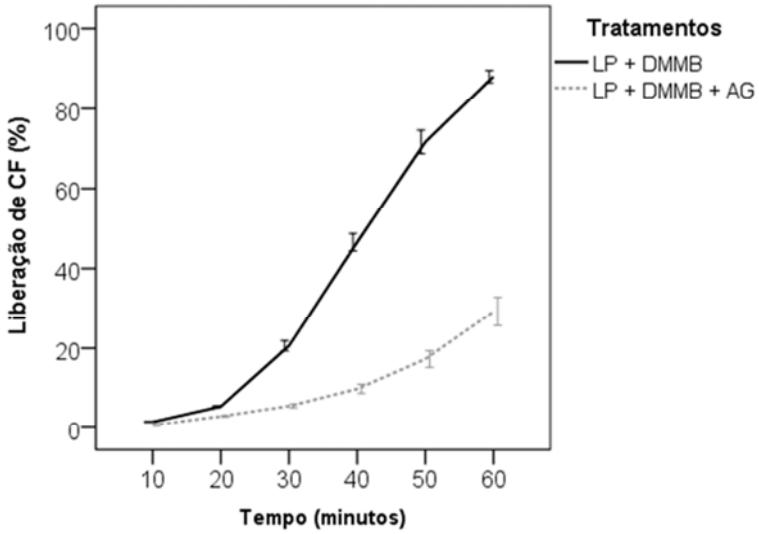
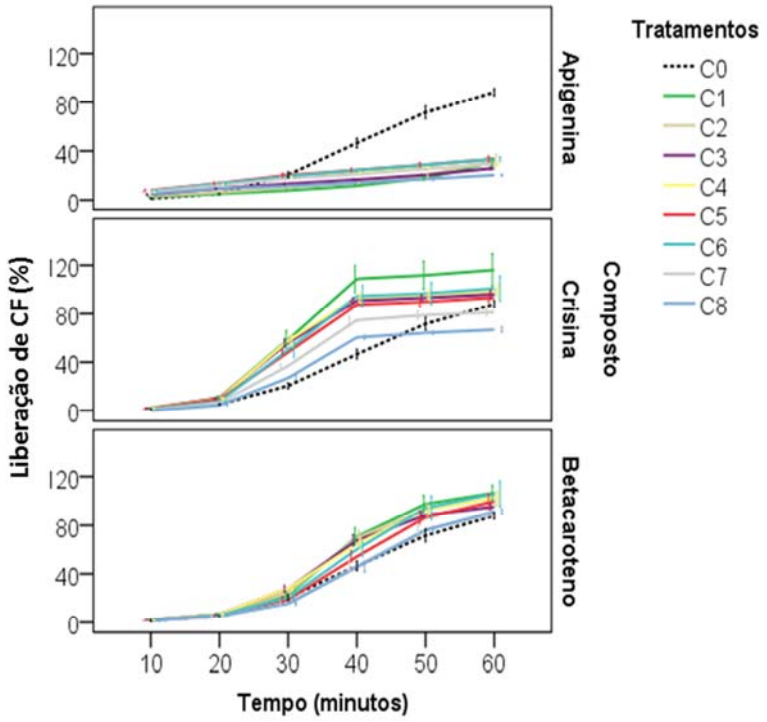


Figura 23 – Danos fotoinduzidos e proteção, em função porcentagem de liberação de carboxifluoresceína (CF), utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador: **A)** Danos nos LP após fotoativação do DMMB por luz VIS (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) e **B)** efeito do ácido gálico (AG) 30 µM (controle positivo). Os resultados correspondem à Média ± E.P.M.

A)



B)

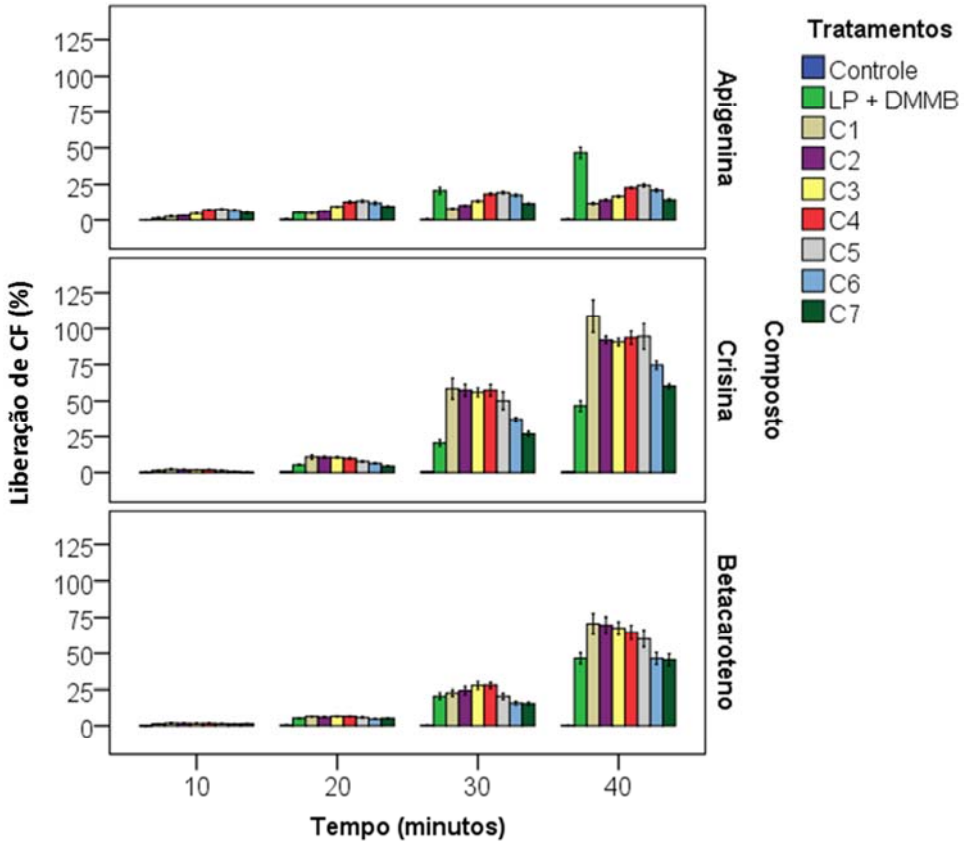


Figura 24 – Efeito da apigenina, crisina e beta-caroteno em diferentes concentrações (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, equivalentes a, respectivamente, 6,8, 10, 14,7, 21,5, 31,6, 46,4, 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$) na liberação de carboxifluoresceína (CF) em função do tempo de irradiação (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador. O controle do experimento corresponde ao LP. Os resultados correspondem à Média ± E.P.M.

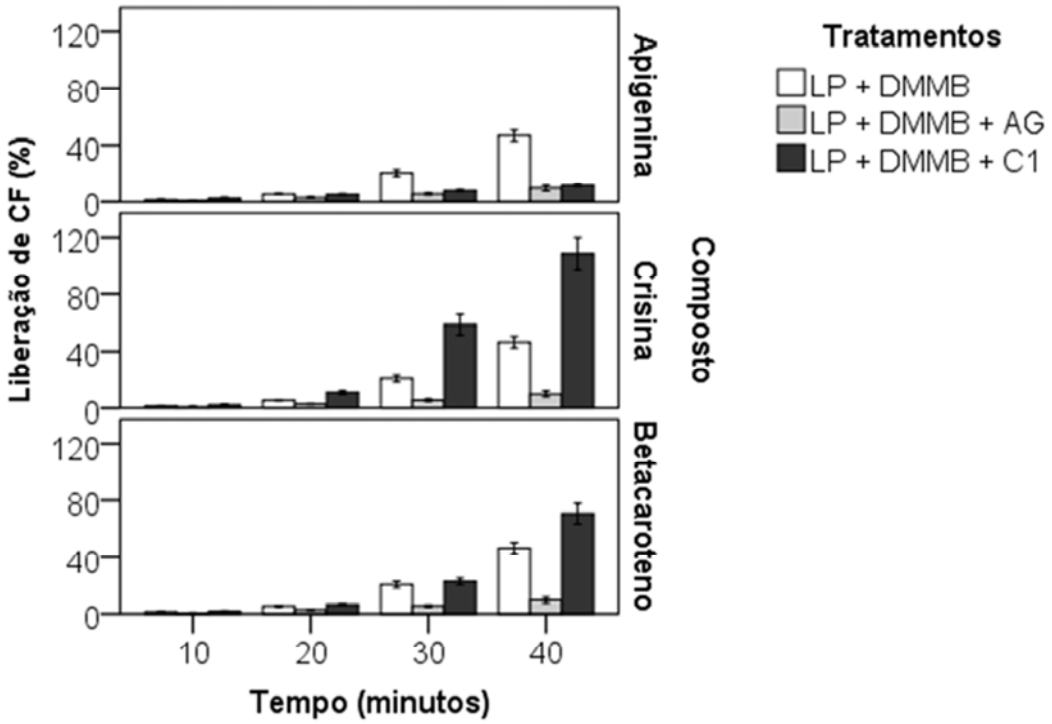


Figura 25 – Efeito do ácido gálico 30 µM (controle positivo) e da apigenina, crisina e beta-caroteno (6,8 µg.mL^{-1}) na porcentagem de carboxifluoresceína (CF) liberada em função do tempo de irradiação (LED 633 nm com 5,32 mW/cm^2 de irradiância) utilizando lipossomas de lecitina de soja (LP) como modelo mimético de membrana biológica e dimetil azul de metileno (DMMB) 15 µM em tampão Tris – NaCl 0,3 M, pH 8,0, como fotossensibilizador. Os resultados correspondem à Média ± E.P.M.

6 Discussão

Nos últimos anos, uma maior atenção tem sido dada à faixa do espectro da radiação solar que compreende a luz VIS, em virtude de a mesma estar envolvida em repostas biológicas que resultam em danos cutâneos *in vivo* (GRETHER-BECK et al., 2014; LIEBEL et al., 2012; RANDHAWA et al., 2015). As informações atuais sobre a contribuição da luz VIS na formação de EROS (LIEBEL et al., 2012) e em outros efeitos provocados na pele, tais como eritema (SKLAR et al., 2013) e pigmentação (CASTANEDO-CAZARES et al., 2014; RANDHAWA et al., 2015), têm gerado discussões com relação ao delineamento de protetores solares, visto que atualmente, a proteção oferecida pela maioria dos protetores solares disponíveis comercialmente não abrange todo espectro da radiação solar e nem sempre previne todos os danos oxidativos, sendo considerada incompleta. Assim, o uso de moléculas antioxidantes eficazes e seguras é crucial para o desenvolvimento de fotoprotetores visando uma proteção de amplo espectro, ou seja, na faixa da UVA/UVB e luz VIS.

Considerando que a radiação UVA e a luz VIS apresentam alto potencial para gerar estresse oxidativo na pele, é importante buscar substâncias capazes de prevenir ou minimizar o impacto desse evento sobre a mesma. Entretanto, atualmente, não há no mercado filtros solares orgânicos que apresentem proteção na faixa da luz VIS. Assim, a adição de antioxidantes nas formulações fotoprotetoras torna-se a melhor alternativa para alcançar a referida proteção e, além disso, também pode proporcionar proteção adicional contra a UVA (KOLBE, 2012).

Os antioxidantes pertencentes à classe dos polifenóis e dos carotenoides estão entre os principais compostos utilizados como agentes fotoprotetores de uso tópico (GONZALEZ et al., 2010). Portanto, com o objetivo de investigar o potencial de uso de antioxidantes pertencentes a tais classes em formulações fotoprotetoras, foram selecionados dois polifenóis (API e CRI) e um carotenoide (BTC) para atingir esse propósito. Estudos recentes demonstraram que a API, a CRI e o BTC são capazes de minimizar o estresse oxidativo induzido pela radiação UV (DAS et al., 2013; TERAO et al., 2011; WU et al., 2011), entretanto nenhuma informação acerca de seus efeitos protetores contra luz VIS foi relatada. Além disso, faltam informações sobre a segurança desses antioxidantes na faixa da UVA e VIS. Tendo em vista que a API e a CRI apresentam espectro de absorção na região do UV, e que o BTC absorve na faixa da UVA e VIS, a absorção de fótons por essas moléculas justifica a preocupação com sua segurança na presença da radiação.

A avaliação da segurança da API, da CRI e do BTC na presença da luz foi realizada, utilizando os antioxidantes isolados e também sua combinação (CMB = API+CRI+BTC), com base no racional proposto pelo guia *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10*

(ICH, 2013). De acordo com esse guia, a essência da avaliação da segurança *in vitro* está fundamentada em três pilares, que consistem na determinação do Coeficiente de Extinção Molar (> 1000 L $mol^{-1}cm^{-1}$) dentro da faixa da luz solar (290-700 nm), na determinação da geração de espécies reativas após absorção de UV/VIS (fotorreatividade) e na determinação de uma resposta aguda à uma substância que é aumentada ou iniciada após exposição à luz (fototoxicidade). Além disso, o estudo de fotoestabilidade também pode contribuir para avaliação da segurança, já que pode sugerir um potencial para fotorreatividade (ICH, 2013).

Apesar de apenas o resultado do estudo de fotoestabilidade não ser suficiente para determinar se avaliações adicionais de fotossegurança são necessárias, a fotoestabilidade representa uma característica importante para os antioxidantes utilizados em fotoprotetores. O uso de moléculas fotoinstáveis pode comprometer a segurança, por meio da formação de intermediários reativos e de produtos de degradação, e ainda a eficácia dos fotoprotetores, devido à redução da quantidade de moléculas ativas e à modificação de sua estrutura química (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007; MARROT et al., 2004). Estudos têm mostrado que alguns antioxidantes apresentam fotolabilidade e também fotorreatividade frente ao UV, o que pode levar à redução da atividade fotoprotetora e antioxidante, respectivamente, dessas moléculas (BONDA; ZHANG; PAVLOVIC, 2011; FREITAS et al., 2015; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007).

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados com a determinação das condições cromatográficas das análises por CLAE. As condições cromatográficas iniciais, incluindo coluna e fase móvel, foram selecionadas com base em estudos anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2010; FREITAS et al., 2015) e em outros da literatura (BARBA et al., 2006; CAI et al., 2006; LI et al., 2005; PELLATI et al., 2013; ZUNINI et al., 2010; YADAV et al., 2013).

Foram estudadas fases móveis com diferentes proporções de metanol, isopropanol e água acidificada com 2% de ácido acético em eluição por gradiente. Os diversos gradientes foram aplicados utilizando um fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$. Inicialmente foi utilizada eluição constante com 80% de água acidificada com 2% de ácido acético (solvente A) e 20% de uma mistura de metanol:isopropanol (30:70) como solvente B; em seguida foi desenvolvido um gradiente linear por 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante com 30% do solvente A por 18,5 minutos, seguida por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante 100% do solvente B por 23 minutos. Com estas condições não foi possível obter a separação dos três antioxidantes em estudo. Assim, foram avaliados outros gradientes, iniciados por eluição constante com 5 ou 15 ou 65% do solvente B por 3

minutos, seguida por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante com 70% do solvente B por 18,5 minutos. Por fim, foi desenvolvido outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante com 100% do solvente B por 23 minutos. Também foram estudadas condições cromatográficas que se iniciavam com eluição constante de 20 ou 25 ou 30 ou 35 ou 40 ou 45 % do solvente B por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 4 minutos, o qual foi mantido com eluição constante com 100% do solvente B por 35 minutos. A partir da análise dos cromatogramas obtidos utilizando os gradientes mencionados, foi observado, através do tempo de retenção dos antioxidantes, que seria possível reduzir o tempo total de análise, e que a melhor separação foi obtida com a eluição que se iniciava com 45% do solvente B. Assim, foi avaliado o seguinte gradiente: eluição constante com 45% de B durante 3 minutos, seguida de um gradiente linear por 4 minutos atingindo 100% de B, o qual foi mantido constante por 13 minutos. Este último método – que consistiu em eluição inicial constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (55:13,5:31,5, v/v) por 3 minutos, seguida por um gradiente linear de 4 minutos, o qual foi mantido com eluição constante de água com 2% de ácido acético:metanol:isopropanol (0:30:70, v/v) por 13 minutos – foi o que proporcionou a melhor separação cromatográfica com o menor tempo de corrida (35 minutos).

Com base em análises de varredura realizadas em espectrofotômetro UV/VIS e em estudos realizados anteriormente (CAI et al., 2006; FREITAS et al., 2015; PELLATI et al., 2013; VILLELA et al., 2011), e também em dados experimentais obtidos nas análises por CLAE, o comprimento de onda empregado para a detecção da API e da CRI foi de 325nm, enquanto que na detecção do BTC foi utilizado o comprimento de onda de 454 nm.

Após o desenvolvimento do método de CLAE, foi realizada sua validação com base nos parâmetros seletividade, linearidade, LD, LIQ, precisão e exatidão intra- e inter-ensaio. Os resultados demonstraram que, de acordo com esses parâmetros, o método é apropriado para a determinação quali e quantitativa da API, da CRI e do BTC (ICH, 2005).

O estudo de fotoestabilidade realizado através da determinação da porcentagem de recuperação dos antioxidantes após análise por CLAE mostrou que a API, a CRI e o BTC, isolados e em combinação (CMB) não sofreram degradação após exposição à UVA/VIS e VIS. A API e a CRI, isoladas ou na combinação exibiram valores de recuperação em torno de 100% em ambas a faixas de radiação avaliadas. Entretanto, na presença da radiação UVA/VIS, o BTC apresentou degradação em torno de 12% quando usado isoladamente, e de 8% quando associado à API e CRI. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foi observada uma degradação de 16% do BTC após avaliar a estabilidade do BTC combinado a

filtros solares e ao *trans*-resveratrol frente à radiação UVA (FREITAS et al., 2015). Nesse mesmo estudo, foram identificados quatro fotoprodutos derivados da degradação induzida pela UVA. No que se refere às flavonas, Choquenet et al. (2009) avaliaram a fotoestabilidade de dez flavonoides, incluindo a API, em termos do FPS e do FPUVA, e após 2 horas de irradiação observaram que a API manteve seu FPS e FPUVA, sendo considerada o melhor filtro UVA entre os flavonoides estudados. Com relação à CRI, não foram encontrados estudos reportando sua fotoestabilidade.

Apesar de a API, a CRI e o BTC terem se mostrado fotoestáveis frente à UVA/ VIS e VIS, esses antioxidantes apresentam Coeficientes de Extinção Molar iguais a 21818 (Abs 334 nm), 12107 (Abs 314 nm) e 84566 L mol^{-1} cm^{-1} (Abs 454 nm), respectivamente. De acordo com o guia *Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10* (ICH, 2013), se uma substância possui coeficiente de extinção molar superior a 1000 L mol^{-1} cm^{-1} (entre 290-700 nm), deve-se considerar a avaliação do seu potencial fotorreativo, um vez que o valor desse coeficiente reflete a eficiência com a qual uma molécula pode absorver um fóton em um comprimento de onda específico. Assim, o potencial fotorreativo dos antioxidantes em estudo foi determinado por meio de um protocolo desenvolvido pela JaCVAM (JACVAM, 2013a), que se baseia na detecção da geração de $^1O_2$ e $O_2^{-\bullet}$.

As principais espécies reativas envolvidas nas respostas fototóxicas parecem ser o $^1O_2$ e o $O_2^{-\bullet}$ (JACVAM, 2013a), o que significa dizer que a determinação de EROS a partir de substâncias irradiadas poderia ser útil para reconhecer seu potencial fototóxico. No ensaio de fotorreatividade, a API, CRI e CMB se mostraram fracamente fotorreativas após irradiação por UVA/VIS devido à habilidade em gerar $O_2^{-\bullet}$ (SA $\geq$ 20). Entretanto, os antioxidantes, isolados ou em combinação, parecem não apresentar potencial para gerar respostas fototóxicas na pele frente à luz VIS, uma vez que não foram fotorreativos nessa faixa do espectro da radiação. Considerando esses resultados, podemos sugerir que a excitação da API, da CRI e do BTC pela luz representa baixa probabilidade de gerar EROS e causar respostas fototóxicas na pele.

O potencial fototóxico dos antioxidantes em estudo induzido pela excitação por UVA/VIS ou VIS foi investigado em modelo *in vitro* (3T3 NRU-PT), utilizando cultura de fibroblastos conforme o protocolo *INVITTOX nº 78* (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002) e o guia *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test* (OECD, 2004). O teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é aceito e validado internacionalmente, sendo que um resultado negativo nesse ensaio sugere baixa probabilidade de a substância apresentar fototoxicidade em animais e em humanos (ICH,

2013). A linhagem de células preconizada para realização deste ensaio consiste em fibroblastos Balb/3T3 clone A31. Entretanto, no presente estudo, optou-se por também conduzir esse ensaio em linhagem de melanócitos murinos normais (Melan-a) e em células de melanoma murino (B16F10), uma vez que a radiação UVA e a luz VIS penetram a pele atingindo a derme, onde estão localizados os melanócitos (FUCHS, 1998). Além disso, a fotossensibilização da melanina pode causar geração de $^1O_2$, o qual está envolvido nas respostas fototóxicas (CHIARELLI-NETO et al., 2014).

No ensaio de fototoxicidade em que foram utilizados os fibroblastos, a CRI, o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico (MPE > 0,15) na presença da UVA/VIS. No entanto, após exposição à luz VIS, apenas o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico (MPE > 0,15). Nos melanócitos normais e nas células de melanoma, foi observada fototoxicidade para todos os antioxidantes e a CMB na faixa da UVA/VIS (MPE > 0,15). Esses resultados corroboram a fototoxicidade observada nos fibroblastos para a CRI, o BTC e a CMB. Entretanto, foi observada diferença na resposta à exposição à luz VIS entre as células Melan-a e B16F10; as células Melan-a apresentaram fototoxicidade à API e ao BTC, enquanto que as da linhagem B16F10 exibiram fototoxicidade à CRI e à CMB.

O espectro de absorção dos antioxidantes em estudo compreende a região do UV e também, no caso do BTC, da luz VIS. Entretanto, os espectros de absorção da API e da CRI são deslocados progressivamente para comprimentos de onda mais longos à medida que o pH da solução aumenta (CASTRO et al., 2005; AMAT et al., 2009). No processo de irradiação, os estados excitados dessas moléculas podem ter provocado fototoxicidade às linhagens avaliadas ao interagir com as moléculas biológicas.

Os resultados do estudo de fototoxicidade utilizando as três linhagens celulares apresentaram uma correlação maior na presença da UVA/VIS, uma vez que os resultados para os fibroblastos foram divergentes daqueles utilizando melanócitos e células de melanoma apenas para a API. Entretanto, na presença da luz VIS foi observada maior variação do potencial fototóxico entre as diferentes linhagens celulares. Além das diferenças no metabolismo celular, outros fatores que poderiam estar relacionados a essas variações são a presença da melanina nos melanócitos e nas células melanoma, e também a diferença de energia no momento da irradiação, uma vez que a energia de excitação da radiação UVA é superior à da luz VIS. Em virtude de a linhagem de fibroblastos Balb/3T3 clone A31 ser a preconizada para a realização do estudo de fototoxicidade *in vitro*, e de não ter sido observada correlação com os melanócitos e as células de melanoma em todos os resultados de fototoxicidade para os antioxidantes avaliados e a CMB, principalmente nos dados

relacionados à exposição ao VIS, a discussão sobre a fototoxicidade, de agora em diante, será aprofundada com base nos resultados da linhagem de fibroblastos.

Na presença da UVA/VIS foi observado potencial fototóxico para a CRI, o BTC e a CMB, sendo que após exposição à luz VIS apenas o BTC e a CMB exibiram tal potencial. Uma característica comum das substâncias que induzem efeitos fototóxicos é sua habilidade em absorver radiação eletromagnética dentro do espectro da radiação solar, uma vez que essa condição é necessária para que ocorra reação fotoquímica (ONOUE; TSUDA, 2006). O potencial fototóxico observado para a CRI, o BTC e a CMB após exposição à UVA/VIS, e para o BTC e a CMB após irradiação por luz VIS, é provavelmente uma consequência da absorção de luz pelos antioxidantes. A fototoxicidade da CRI e da CMB também pode ter ocorrido em consequência da geração de $O_2^{-\bullet}$ detectada no estudo de fotorreatividade. Além disso, considerando que a CRI, o BTC e a CMB foram considerados fotoestáveis, e que a CRI e o BTC foram fracamente e não fotorreativos, respectivamente, outro possível mecanismo que poderia explicar sua fototoxicidade seria a transferência de energia do estado excitado inicial da molécula para a membrana celular levando à oxidação dos lipídios e proteínas, o que caracteriza uma reação citotóxica na presença da luz, ou seja, fotoirritação (OECD, 2004; ONOUE; TSUDA, 2006).

Em conjunto, os resultados dos estudos de fotoestabilidade e fotorreatividade sugerem que a API, a CRI, o BTC e a CMB são relativamente seguros, mostrando-se compatíveis para o uso em formulações fotoprotetoras; entretanto a CRI, o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico em fibroblastos. É fato conhecido que o ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU superestima os resultados e não leva em consideração a biodisponibilidade e a biocinética das substâncias avaliadas (HENRY et al., 2009). Assim, a fototoxicidade da CRI, do BTC e da CMB deve ser melhor investigada e modelos de pele tridimensional que possuam todas as camadas da epiderme, principalmente o estrato córneo, e também por meio de abordagens *in vivo* (GASPAR et al., 2013; ICH, 2013) para avaliar se a produção de $O_2^{-\bullet}$ e a fototoxicidade observada em cultura de monocamadas podem levar à danos cutâneos induzidos pela radiação UVA e luz VIS.

Os resultados dos estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade foram utilizados para avaliar a segurança da utilização da API, da CRI, do BTC e da CMB em formulações visando fotoproteção. Cumpre salientar que esses resultados foram publicados recentemente no periódico *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (FREITAS; GASPAR, 2016). Esses resultados sugerem que seu uso é mais seguro na faixa da luz VIS, e que a combinação dos três antioxidantes em estudo (CMB) não traz vantagens, quanto à

segurança, em relação ao seu uso isoladamente. Por isso, a avaliação do efeito protetor da API, da CRI e do BTC será realizada utilizando-os isoladamente e apenas na presença da luz VIS.

Diversos cromóforos endógenos absorvem luz VIS, principalmente a melanina (MAHMOUD et al., 2008), cujo espectro de absorção compreende comprimentos de onda entre 200 e 900nm (ZONIOS et al., 2008). Já foi demonstrado que a incidência de radiação UV e luz VIS sobre a melanina, provocam a formação de $^1O_2$ por meio da fotossensibilização dessa molécula (UCHOA et al., 2008). Além disso, Chiarelli-Neto et al. (2014) observaram que a luz VIS pode induzir à fototoxicidade em células B16F10, devido à fotossensibilização da melanina. Considerando que a fotossensibilização da melanina pela luz VIS pode gerar $^1O_2$ e, a partir daí provocar danos cutâneos, o efeito protetor da API, da CRI e do BTC em cultura de células foi avaliado com base nos danos induzidos pela melanina durante exposição à luz VIS. As células B16F10 respondem ao tratamento para indução de melanogênese constituindo um bom modelo *in vitro* para realizar a pretendida avaliação, por isso essa foi a linhagem escolhida para conduzir esses estudos.

O estudo de proteção dos antioxidantes contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10 foi iniciado com a padronização das condições de indução de melanogênese e da dose de luz VIS que foram utilizados no estudo. Primeiramente, foi realizada a quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese utilizando L-tirosina 1 mM e NH_4Cl (2,5, 5, 7,5 e 10 mM) com o intuito de definir a condição que proporcionasse um aumento significativo na síntese de melanina pelas células B16F10. Foi observado que o tratamento das células B16F10 com L-tirosina combinada ao NH_4Cl resultou em um aumento significativo do conteúdo de melanina em todas as concentrações avaliadas. Foram alcançados aumentos da síntese de melanina, em relação ao controle, de aproximadamente 16, 28, 36 e 33 vezes, após tratamento das células com L-tirosina e concentrações crescentes de NH_4Cl equivalentes a 2,5 5, 7,5 e 10 mM, respectivamente. Quando o NH_4Cl foi utilizado nas concentrações de 7,5 e 10mM, foi observado um aumento semelhante na síntese de melanina ($p = 1,0$). Em estudos anteriores, nos quais a indução da melanogênese em células B16F10 foi realizada utilizando NH_4Cl 10 mM combinado com L-tirosina 0,4 mM (CUNHA et al., 2012; KONGSHOJ et al., 2007), 0,5 mM (CHIARELLI-NETO et al., 2014) e 1mM (KONGSHOJ et al., 2007) por 48 horas também foi observado um aumento significativo na síntese de melanina. Isso mostra que no presente estudo, as condições de indução de melanogênese foram efetivas e otimizadas, uma

vez que as células foram tratadas por um período de 24 horas utilizando uma concentração quatro vezes menor de NH_4Cl.

Após avaliar diferentes condições de indução de melanogênese utilizando L-tirosina 1 mM e NH_4Cl (2,5, 5, 7,5 e 10 mM) por 24 horas, a fototoxicidade induzida pela melanina foi avaliada, nessas mesmas condições, por meio da viabilidade das células B16F10 na presença de 12 J/cm^2 de luz VIS. Os resultados mostraram que após irradiação houve redução da viabilidade das células tratadas com L-tirosina combinada com NH_4Cl em relação ao controle (não tratado), que apresentava nível basal de melanina ($p < 0,0001$). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Chiarelli-Neto et al. (2014), que observaram que, nas células com nível basal de melanina, a luz VIS praticamente não induziu à morte celular; entretanto nas células que receberam tratamento para indução de melanogênese (L-tirosina 0,5 mM e NH_4Cl 10mM) houve redução considerável na viabilidade celular (CHIARELLI-NETO et al., 2014). Quando o NH_4Cl foi utilizado nas concentrações de 7,5 e 10 mM, não foi observada diferença na viabilidade celular ($p = 0,254$). No presente estudo, ao correlacionar os resultados do estudo de quantificação do teor de melanina em diferentes condições de indução de melanogênese aos resultados obtidos após a determinação da viabilidade celular nessas mesmas condições, foi observada uma relação dose-dependente entre o conteúdo de melanina e a morte celular ao utilizar L-tirosina 1 mM e NH_4Cl (2,5, 5 e 7,5 mM), uma vez que o aumento da melanogênese levou ao aumento da fototoxicidade das células irradiadas com luz VIS ($p < 0,0001$). Além disso, o tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina por 24 horas foi o que resultou em um aumento significativo da síntese de melanina e em maior viabilidade celular após irradiação pela luz VIS. Dessa forma, essa condição foi considerada ideal para indução de melanogênese seguida por irradiação, sendo utilizada nos estudos posteriores para avaliar a proteção contra os danos induzidos pela fotossensibilização da melanina em células B16F10.

Após a determinação da condição ideal para induzir à melanogênese nas células, a sensibilidade das células B16F10 com níveis basais de melanina e, também, após indução da melanogênese por tratamento com 2,5 mM de NH_4Cl e 1mM de L-tirosina, foi avaliada na presença de 12, 24 e 36 J/cm^2 de luz VIS. Quando as células foram irradiadas com 12 e 24 J/cm^2 de luz VIS, foi observada grande variabilidade na morte celular. Entretanto, a irradiação com 36 J/cm^2 de luz VIS resultou em pequena variabilidade e viabilidade média de 100 e 65%, respectivamente, tanto das células com nível basal de melanina quanto das que receberam tratamento com NH_4Cl e L-tirosina. De forma semelhante, em estudo anterior, no qual a toxicidade das células B16F10 à luz VIS foi avaliada utilizando a mesma dose de

radiação (36 J/cm^2), foi observada morte celular de 25% para as células que receberam tratamento para indução de melanogênese (CHIARELLI-NETO et al., 2014). Assim, a dose de 36 J/cm^2 foi considerada ideal para irradiação das células B16F10 nos estudos para avaliar o efeito protetor da API, da CRI e do BTC sob a morte induzida pela fotossensibilização da melanina.

Previamente à avaliação do efeito protetor dos antioxidantes, decidimos confirmar a relação entre a toxicidade da luz VIS em células com elevado teor de melanina e a geração de $^1O_2$, através da medida do espectro de emissão de $^1O_2$ no infravermelho próximo, após excitação em 450 nm. Foi observado que as células controle (nível basal de melanina) apresentaram sinal basal de emissão de $^1O_2$, enquanto as que receberam tratamento para indução de melanogênese com NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM exibiram um espectro de emissão que evidenciou a geração dessa espécie reativa. Esses resultados corroboram os obtidos por Chiarelli-Neto et al. (2014), que demonstraram que a excitação da melanina em 532 nm leva à formação de $^1O_2$ em células B16F10 com elevado teor de melanina e à consequente fototoxicidade na presença da luz VIS em virtude da fotossensibilização da melanina.

Uma vez demonstrado que a indução de melanogênese com NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM seguida da irradiação com 36 J/cm^2 de luz VIS induz à fototoxicidade das células B16F10 devido à geração de $^1O_2$ provocada pela fotossensibilização da melanina, foi iniciado o estudo em cultura de células para avaliar o efeito protetor da API, da CRI e do BTC contra os danos induzidos pela luz VIS. Nas células com níveis basais de melanina, o tratamento com o BTC não interferiu na sobrevida celular após irradiação. Entretanto, o tratamento com a API a partir de 14,7 µg.mL^{-1} levou à redução da sobrevida celular, e o tratamento com a CRI provocou uma redução acentuada da sobrevida celular a partir de 10 µg.mL^{-1}. Esses resultados estão de acordo com os obtidos no ensaio de fototoxicidade realizado em células B16F10 no presente estudo, com base no guia *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test* (OECD, 2004), segundo o qual foi detectado potencial fototóxico para a CRI (MPE > 0,15). Com relação às células que receberam tratamento para indução de melanogênese, os resultados desse estudo mostraram que a API proporcionou uma supressão significativa do efeito fototóxico da luz visível em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$), em relação às células não tratadas. A CRI conferiu proteção às células contra fotossensibilização da melanina apenas quando utilizada na concentração de 6,8 µg.mL^{-1} ($p < 0,05$), sendo que nas concentrações 14,7, 46,4, 68,1 e 100 µg.mL^{-1} foi observada redução na viabilidade celular em relação ao controle, que

pode ter sido devida a um efeito pró-oxidante provocado pelo aumento da concentração (TSUJI; WALLE, 2008). O estudo realizado por Nagai, Ohara e Mukai (2005) sugere que API e a CRI podem atuar como *quenchers* de $^1O_2$ em sistemas biológicos, e que a capacidade de atuar como *quencher* depende do número de hidroxilas, sendo maior nos flavonoides com mais hidroxilas. A API apresenta três hidroxilas em sua estrutura molecular, enquanto a CRI possui apenas duas. Assim, o aumento da sobrevida celular observado em função do tratamento das células com API e CRI pode ter ocorrido pela neutralização do $^1O_2$ gerado pela fotossensibilização da melanina pela luz VIS. Em relação ao BTC, foi observado aumento da sobrevida celular após irradiação por luz VIS quando as células foram tratadas usando as concentrações 6,8, 46,4, 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$ ($p < 0,05$), o que pode ter sido devido à sua capacidade de atuar como *quencher* do $^1O_2$ (MORTENSEN, 2001).

A síntese de melanina é estimulada pela luz VIS nos fototipos cutâneos IV a VI (MAHMOUD et al., 2010). No presente estudo foi demonstrado que o aumento do conteúdo de melanina está relacionado ao aumento da toxicidade da luz VIS devido à sua fotossensibilização. Isso mostra a importância desse estudo, já que foi observado que a API pode proteger as células contra a fototoxicidade da melanina induzida pela luz VIS.

A proteção oferecida pela API, CRI e BTC contra os danos induzidos pela luz VIS também foi avaliada em modelo mimético de membrana celular, que consistiu em lipossomas construídos a partir da lecitina de soja. Nesse estudo foi avaliada a proteção contra os danos provocados na membrana pela fotossensibilização do DMMB, induzida pela excitação em 633 nm durante 90 min, através da determinação da porcentagem de liberação de CF do interior dos lipossomas. A irradiação do DMMB pela luz VIS (633 nm) provoca sua fotoativação com consequente geração de $^1O_2$, que por sua vez causa a oxidação dos lipídios da membrana e o aumento da permeabilidade da CF (BACELLAR et al., 2014). Na presença do DMMB, foi observado um aumento crescente da liberação de CF em função do tempo, o qual se manteve constante a partir 60 minutos de irradiação. Entretanto, de 40 a 60 minutos de irradiação, o padrão de liberação de CF se manteve praticamente constante em relação ao tratamento com diferentes concentrações de API, CRI e BTC. Assim, as diferenças estatísticas no dano fotoinduzido promovido pelo DMMB segundo o tratamento com os antioxidantes foram avaliadas considerando o tempo de irradiação de 40 minutos. De acordo com essas análises, a API foi capaz de proteger eficientemente a membrana contra os danos provocados pelo DMMB em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,0001$); entretanto, a CRI e o BTC não conferiram proteção, uma vez que houve danos significativos à membrana. De maneira geral, ao avaliar os resultados, nota-se que a partir de 40 minutos de irradiação há uma

diferença maior da porcentagem de liberação de CF na presença dos antioxidantes em relação ao controle (lipossomas+DMMB). Entretanto, é importante ressaltar que, não foi observado um padrão dose-dependente na liberação de CF, ou seja, o aumento na concentração dos antioxidantes não alterou a porcentagem de liberação de CF. Ao atingir 40 minutos de irradiação, foi observada liberação de em média 46% de CF na amostra controle, sendo que o tratamento com API (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) resultou em liberação de CF de apenas 12%; entretanto, o tratamento com CRI (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) e BTC (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) levou à liberação de CF de, em média, 100 e 70%, respectivamente. Nesse tempo, o aumento da concentração de API de 6,8 a 100 $\mu g.mL^{-1}$ não resultou em aumento da proteção de membrana ($p = 0,274$). Esse mesmo padrão foi observado para a CRI e para o BTC.

O ácido gálico, conhecido por seu elevado potencial antioxidante (ASNAASHARI et al., 2014; BADHANI et al., 2015), foi utilizado como um padrão (controle positivo) no presente estudo (RODRIGUES et al., 2016), e mostrou-se capaz de proteger eficientemente a membrana contra os danos fotoinduzidos pela luz VIS, visto que foi registrada uma porcentagem de liberação de CF de, em média 10%, ao final de 40 minutos de irradiação. Rodrigues et al. (2016) avaliaram a proteção de membrana utilizando *Aloe vera* (10 $mg.mL^{-1}$), e observaram redução de 75% da liberação de CF e proteção comparável à oferecida pela ácido gálico. No presente estudo, o tratamento com API (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) resultou em uma porcentagem de liberação de CF de, em média 12%, ao final de 40 minutos de irradiação, sendo equivalente à proteção oferecida pela ácido gálico. Esses resultados demonstram forte evidência do potencial da API para proteger a membrana celular contra os danos fotooxidativos induzidos pela luz VIS.

Em conjunto, os resultados do estudo de proteção contra os danos induzidos pela luz VIS em células B16F10 e em modelo mimético de membrana sugerem que, entre os antioxidantes estudados, a API é o que apresenta maior potencial fotoprotetor, pois além de proteger as células B16F10 dos danos induzidos pela fotossensibilização da melanina, a API também mostrou potencial para em proteger a membrana celular dos danos fotooxidativos.

Finalizando, o uso de cosméticos contendo ativos naturais representa um apelo recorrente no mercado atual, sendo que a adição de antioxidantes a fotoprotetores visando complementar e/ou ampliar seu espectro de proteção para a UVA e VIS tem sido uma tendência no delineamento de formulações fotoprotetoras de amplo espectro (UVB, UVA e VIS). Assim, o presente estudo apresenta uma grande contribuição quanto ao potencial de uso de três antioxidantes de origem natural (API, CRI, BTC) na proteção contra a radiação UVA e luz VIS através da avaliação da sua segurança e eficácia. Com relação à segurança, os

resultados dos estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade e fototoxicidade sugerem que o uso da API, da CRI, do BTC e da sua CMB visando a fotoproteção da pele é mais seguro na faixa da luz VIS. Além disso, a API foi o antioxidante que apresentou a melhor performance entre os estudados, uma vez que foi fotoestável e não fototóxica na presença de UVA/VIS e fotoestável, não fotorreativa e não fototóxica frente à luz VIS. Considerando a eficácia, os resultados do estudo de proteção contra os danos induzidos frente à luz VIS pela fotossensibilização da melanina em células B16F10 e pela fotooxidação de membrana em modelo mimético sugerem que, entre os antioxidantes estudados, a API é o mais promissor para utilização em formulações fotoprotetoras. De forma geral, o presente estudo mostrou que a API apresenta elevado potencial para uso na proteção contra a luz VIS.

7 Conclusões

7.1 Conclusão geral

A investigação do potencial de uso da API, da CRI e do BTC na proteção contra a radiação UVA e luz VIS através de ensaios *in vitro* conduzidos para avaliar características relacionadas à sua segurança mostrou que o uso de tais antioxidantes e da sua CMB visando a fotoproteção da pele é mais seguro na faixa da luz VIS. Em relação à eficácia frente à luz VIS, os antioxidantes foram capazes de proteger as células contra morte induzida pela fotossensibilização da melanina, sendo que o efeito da API foi superior ao da CRI e do BTC. Além disso, no estudo de proteção de membrana, apenas a API foi capaz de conferir proteção contra os danos fotooxidativos induzidos pela luz VIS. Finalizando, a API é o mais promissor entre os antioxidantes estudados em relação à segurança e à eficácia, e apresenta elevado potencial de uso na proteção contra a luz VIS.

7.2 Conclusões específicas

- O método de CLAE foi validado por meio da determinação da seletividade, linearidade, LD, LIQ, precisão e exatidão intra- e inter-ensaio; e é apropriado para a determinação quali e quantitativa da API, da CRI e do BTC.
- O estudo de fotoestabilidade mostrou que a API, a CRI e o BTC, isolados e em combinação (CMB) não sofreram degradação após exposição à radiação UVA/VIS e VIS. A API e a CRI, isoladas ou na combinação, exibiram valores de recuperação em torno de 100% em ambas a faixas de radiação avaliadas. Entretanto, na presença da radiação UVA/VIS o BTC apresentou degradação quando usado isoladamente (~12%) e quando associado à API e CRI (~8%).
- No ensaio de fotorreatividade, a API, a CRI e a CMB se mostraram fracamente fotorreativas após irradiação por UVA/VIS devido à habilidade em gerar $O_2^{-\bullet}$. Na presença da luz VIS os antioxidantes não foram fotorreativos.
- No ensaio de fototoxicidade em que foram utilizados os fibroblastos, a CRI, o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico na presença de UVA/VIS. No entanto, após exposição à luz VIS, apenas o BTC e a CMB apresentaram potencial fototóxico. Nos melanócitos normais e nas células de melanoma, foi observada fototoxicidade para todos os antioxidantes e a CMB na faixa do UVA/VIS. Após exposição à luz VIS as células Melan-a apresentaram fototoxicidade à API e ao BTC, enquanto que as da linhagem B16F10 exibiram fototoxicidade à CRI e à CMB.

- No ensaio para quantificar a geração de $^1O_2$, as células B16F10 controle (nível basal de melanina) apresentaram sinal basal de emissão de $^1O_2$, enquanto as que receberam tratamento para indução de melanogênese com NH_4Cl 2,5 mM e L-tirosina 1 mM exibiram um espectro de emissão que evidenciou a geração de $^1O_2$.
- Nas células que receberam tratamento para indução de melanogênese, a API proporcionou aumento da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, após irradiação por luz VIS em relação às células não tratadas. A CRI conferiu proteção às células contra fotossensibilização da melanina apenas quando utilizada na concentração de 6,8 $\mu g.mL^{-1}$. O tratamento com BTC nas concentrações 6,8, 46,4, 68,1 e 100 $\mu g.mL^{-1}$, por sua vez, levou ao aumento da sobrevida celular após irradiação por luz VIS .
- No ensaio para avaliar a proteção de membrana contra os danos induzidos pela luz VIS em modelo mimético de lipossomas, a API foi capaz de proteger eficientemente a membrana contra os danos provocados pelo DMMB em todas as concentrações avaliadas; entretanto, a CRI e o BTC não conferiram proteção, uma vez que houve danos significativos à membrana. Além disso, o tratamento com API (6,8 $\mu g.mL^{-1}$) resultou em uma porcentagem de liberação de CF de, em média 12%, ao final de 40 minutos de irradiação, sendo equivalente à proteção oferecida pela ácido gálico, que corresponde ao controle positivo do ensaio.

8 Referências

AMAT, A.; CLEMENTI, C.; DE ANGELIS, F.; SGAMELLOTTI, A; FANTACCI, S. Absorption and Emission of the Apigenin and Luteolin Flavonoids: A TDDFT Investigation. **Journal of Physical Chemistry A,** v. 113, n. 52, p. 15118-15126, 2009.

ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry,** v. 159, p. 439-444, 2014.

BACELLAR, I. O. L.; PAVANI, C.; SALES, E. M.; ITRI, R.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology,** v. 90, n. 4, p. 801-813, 2014.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances,** v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.

BAI, S. K.; LEE, S .J.; NA, H. J.; HA, K. S.; HAN, J. A.; LEE, H.; KWON, Y. G.; CHUNG, C. K.; KIM, Y. M. Beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Experimental & Molecular Medicine**, v.37, n.4, p.323-334, 2005.

BANDO, N.; HAYASHI, H.; WAKAMATSU, S.; INAKUMA, T.; MIYOSHI, M.; NAGAO, A.; YAMAUCHI, R.; TERAO, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β-carotene:an *ex vivo* study. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.1854–1863, 2004.

BAPTISTA, M. S.; CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A. S.; SEVERINO, D. **Photosensitization of melanin and generation of singlet oxygen: effect of visible light in hairs and skin**. In: 27th IFSCC Congress, Johannesburg 2012.

BARBA, A. I. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. C. S.; RUIZ, V. F.; TEJADA, M. L. S. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β-carotene in vegetables. **Food Chemistry,** v. 95, p. 328-336, 2006.

BARIYA, S. H.; GOHEL, M. C.; MEHTA, T. A.; SHARMA, O. P. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** v. 64, n. 1, p. 11-29, 2012.

BEGUM, N.; PRASAD, N. R.; KANIMOZHI, G.; HASAN, A. Q. Apigenin ameliorates gamma radiation-induced cytogenetic alterations in cultured human blood lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,** v. 747, n. 1, p. 71-76, 2012.

BERETTA, G.; FACINO, R. M. Recent advances in the assessment of the antioxidant capacity of pharmaceutical drugs: from *in vitro* to *in vivo* evidence. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 398, n. 1, p. 67-75, 2010.

BLACK, H. S.; LENGER, W.; MCCANN, V.; THORNBY, J. I. Relation of UV dose to antioxidant modification of photocarcinogenesis. **Journal of the American College of Toxicology,** v. 2, n. 2, p. 201-207, 1983.

BOHM, F.; HALEY, J.; TRUSCOTT, T. G.; SCHALCH, W. Cellular bound beta-carotene quenches singlet oxygen in man. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 21, n. 2-3, p. 219-221, 1993.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. **Medicinal chemistry,** v. 4, n. 7, p. 517-522, 2014.

BONDA, C.; ZHANG, J.; PAVLOVIC, A. The photostability and photostabilization of *trans*- resveratrol. **Cosmetic&Toiletries,** v. 126, n. 9, p. 652-660, 2011.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMAIER, K. Antioxidant effects of flavonoids. **Biofactors,** v. 6, n. 4, p. 399-402, 1997.

BOTTA, C.; DI GIORGIO, C.; SABATIER, A.-S.; DE MEO, M. Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 91, n. 1, p. 24-34, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** 2. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2012. 2012a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 jun. 2012b.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, n. 3, p. 539-549, 2008.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Faseb Journal,** v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

CAI, H.; RAYNAUD, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. A simple HPLC method for the determination of apigenin in mouse tissues. **Biomedical Chromatography,** v. 20, n. 10, p. 1038-1042, 2006.

CAMPOS, A.; GUTERRES, Y.; BAUER, E.B.; MOREIRA, M.C. High Brightness LEDs Supplied by Electronics Converters Used in Tissue Healing and Cell Rejuvenation. In: SERRA, P.A. **Advances in Bioengineering.** 2015. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-bioengineering/high-brightness-leds-supplied-by-electronics-converters-used-in-tissue-healing-and-cell-rejuvenation >. Acesso em 12 maio 2016.

CASTANEDO-CAZARES, J. P.; J., HERNANDEZ-BLANCO, D.; CARLOS-ORTEGA, B.; FUENTES-AHUMADA, C.; TORRES-ALVAREZ, B. Near-visible light and UV photoprotection in the treatment of melasma: a double-blind randomized trial. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 1, p. 35-42, 2014.

CASTRO, G. T.; FERRETTI, F. H.; BLANCO, S. E. Determination of the overlapping pK(a) values of chrysin using UV-vis spectroscopy and ab initio methods. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v. 62, n. 1-3, p. 657-665, 2005.

CHEDEKEL, M. R.; SMITH, S. K.; POST, P. W.; POKORA, A.; VESSELL, D. L. Photodestruction of pheomelanin - role of oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 75, n. 11, p. 5395-5399, 1978.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free-radical biochemistry. **British Medical Bulletin,** v. 49, n. 3, p. 481-493, 1993.

CHIARELLI-NETO, O.; FERREIRA, A. S.; MARTINS, W. K.; PAVANI, C.; SEVERINO, D.; FAIAO-FLORES, F.; MARIA-ENGLER, S. S. et al. Melanin Photosensitization and the Effect of Visible Light on Epithelial Cells. **Plos One,** v. 9, n. 11, 2014.

CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A. S.; UCHOA, A. F.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 51, n. 6, p. 1195-1202, 2011.

CHO, H. Y.; YUN, C. W.; PARK, W. K.; KONG, J. Y.; KIM, Y. S.; PARK, Y. M.; LEE, S. Y. et al. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. **Pharmacological Research,** v. 49, n. 1, p. 37-43, 2004.

CHOQUENET, B.; COTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Flavonoids and Polyphenols, Molecular Families with Sunscreen Potential: Determining Effectiveness with an *in vitro* Method. **Natural Product Communications,** v. 4, n. 2, p. 227-230, 2009.

CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P. et al. What is the 'true' function of skin? Viewpoint 1. **Experimental Dermatology,** v. 11, n. 2, p. 159-163, 2002.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A. Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. **Central European Journal of Biology,** v. 8, n. 4, p. 315-330, 2013.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMINSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatologii I Alergologii,** v. 30, n. 1, p. 30-41, 2013.

CONN, P. F.; LAMBERT, C.; LAND, E. J.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. Carotene oxygen radical interactions. **Free Radical Research Communications,** v. 16, n. 6, p. 401-408, 1992.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **Faseb Journal,** v. 21, n. 4, p. 976-994, 2007.

CUNHA, E. S.; KAWAHARA, R.; KADOWAKI, M. K.; AMSTALDEN, H. G.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; WINNISCHOFER, S. M. B. et al. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experimental Cell Research,** v. 318, n. 15, p. 1913-1925, 2012.

DALY, C. H. Biomechanical properties of dermis. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 79, p. S17-S20, 1982.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 87, n. 2, p. 95-104, 2007.

DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 82, n. 3, p. 204-213, 2006.

DARVIN, M. E.; FLUHR, J. W.; MEINKE, M. C.; ZASTROW, L.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. **Experimental Dermatology,** v. 20, n. 2, p. 125-129, 2011.

DAS, S.; DAS, J.; PAUL, A.; SAMADDER, A.; KHUDA-BUKHSH A. R. Apigenin, a Bioactive Flavonoid from Lycopodium clavatum, Stimulates Nucleotide Excision Repair Genes to Protect Skin Keratinocytes from Ultraviolet B-Induced Reactive Oxygen Species and DNA Damage. **Journal of Acupuncture & Meridian Studies,** v. 6, n. 5, p. 252-262, 2013.

DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 16, p. 47-52, 1994.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 43, n. 6, p. 1024-1035, 2000.

EBANKS, J. P.; WICKETT, R. R.; BOISSY, R. E. Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 10, n. 9, p. 4066-4087, 2009.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clinics in Dermatology,** v. 13, n. 4, p. 375-380, 1995.

EPE, B. DNA damage spectra induced by photosensitization. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 11, n. 1, p. 98-106, 2012.

EPSTEIN, H. A. The next frontier of sunscreen protection: beyond sunscreens. **Skinmed,** v. 9, n. 4, p. 247-250, 2011.

EVELSON, P.; ORDONEZ, C. P.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Oxidative stress and *in vivo* chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 38, n. 2-3, p. 215-219, 1997.

FERREIRA, R. D.; GRECO, S. J.; DELARMELINA, M.; WEBER, K. C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. **Electrochimica Acta,** v. 163, p. 161-166, 2015.

FREITAS, J. V.; LOPES, N. P.; GASPAR, L. R. Photostability evaluation of five UV-filters, trans-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 78, p. 79-89, 2015.

FREITAS, J. V.; GASPAR, L. R. *In vitro* photosafety and efficacy screening of apigenin, chrysin and beta-carotene for UVA and VIS protection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 146-153, 2016.

FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 25, n. 7, p. 848-873, 1998.

FUCHS, J.; HUFLEJT, M. E.; ROTHFUSS, L. M.; WILSON, D. S.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Acute effects of near ultraviolet and visible-light on the cutaneous antioxidant defense system. **Photochemistry and Photobiology,** v. 50, n. 6, p. 739-744, 1989.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 307, n. 2, p. 123-128, 2006.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 2007.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. **Talanta,** v. 82, n. 4, p. 1490-1494, 2010.

GASPAR, L. R.; THARMANN, J.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; LIEBSCH, M. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro,** v. 27, n. 1, p. 418-425, 2013.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermo-Sifiliográficas,** v. 101, p. 659-672, 2010.

GOH, M.-J.; LEE, H.-K.; CHENG, L., KONG, D.-Y.; YEON, J.-H.; HE, Q.-Q.; CHO, J.-C. et al. Depigmentation Effect of Kadsuralignan F on Melan-A Murine Melanocytes and Human Skin Equivalents. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 14, n. 1, p. 1655-1666, 2013.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clin Dermatol,** v. 26, n. 6, p. 614-26, 2008.

GONZALEZ, S.; PHILIPS, N.; GILABERTE, Y. Photoprotection: update in UV-filter molecules, the "new wave" of sunscreens. **Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia,** v. 145, n. 4, p. 515-523, 2010.

GRETHER-BECK, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; KRUTMANN, J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 2-3, p. 167-174, 2014.

GURUVAYOORAPPAN, C.; KUTTAN, G. Beta-carotene inhibits tumor-specific angiogenesis by altering the cytokine profile and inhibits the nuclear translocation of transcription factors in B16F-10 melanoma cells. **Integrative Cancer Therapies,** v. 6, n. 3, p. 258-270, 2007.

HAAG, S. F.; TSCHERCH, K.; ARNDT, S.; KLEEMANN, A.; GERSONDE, I.; LADEMANN, J.; ROHN, S. et al. Enhancement of skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after the application of a hyperforin-rich cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 86, n. 2, p. 227-233, 2014.

HAYWOOD, R.; WARDMAN, P.; SANDERS, R.; LINGE, C. Sunscreens inadequately protect against ultraviolet-A-induced free radicals in skin: Implications for skin aging and melanoma? **Journal of Investigative Dermatology,** v. 121, n. 4, p. 862-868, 2003.

HENRY, B.; FOTI, C.; ALSANTE, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 96, n. 1, p. 57-62, 2009.

HOFFMANN-DORR, S.; GREINERT, R.; VOLKMER, B.; EPE, B. Visible light (> 395 nm) causes micronuclei formation in mammalian cells without generation of cyclobutane pyrimidine dimers. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,** v. 572, n. 1-2, p. 142-149, 2005.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).** 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em 01 jun 2016.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10.** 2013. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/S10_Step_4.pdf>. Acesso em 01 jun 2016.

JACVAM. ROS assay Validation Management Team. **Reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals. ROS Assay Protocol**, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, 2013. 2013a. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JACVAM. ROS assay validation management team. **Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version)**, 2013. 2013b. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full 20131009Seric fourth.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JACVAM. ROS assay validation management team. **Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version)**, 2013. 2013c. Disponível em: <http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full 20130920 atlas_fourth data.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

JEONG, G.-S.; LEE, S.-H.; JEONG, S.-N.; KIM, Y.-C.; KIM, E.-C. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. **International Immunopharmacology,** v. 9, n. 12, p. 1374-1380, 2009.

JOU, P. C.; FELDMAN, R. J.; TOMECKI, K. J. UV protection and sunscreens: What to tell patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine,** v. 79, n. 6, p. 427-436, 2012.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology-Mysore,** v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KHAN, M. S.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 251, n. 1, p. 85-94, 2011.

KIM, D.-C.; RHO, S.-H.; SHIN, J.-C.; PARK, H. H.; KIM, D. Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 411, n. 1, p. 121-125, 2011.

KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology,** v. 13, p. 91-110, 2012.

KOLBE, L. How Much Sun Protection Is Needed?: Are We on the Way To Full-Spectrum Protection? **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 7, p. 1756-1757, 2012.

KOLLIAS, N.; BAQER, A. An experimental-study of the changes in pigmentation in human-skin *invivo* with visible and near-infrared light. **Photochemistry and Photobiology,** v. 39, n. 5, p. 651-659, 1984.

KONGSHOJ, B.; MIKKELSEN, N. D.; KOBAYASI, T.; LERCHE, C. M.; WULF, H. C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis *in vitro* but not *in vivo* even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 23, n. 5, p. 197-202, 2007.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry,** v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

LAVKER, R. M.; VERES, D. A.; IRWIN, C. J.; KAIDBEY, K. H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 62, n. 2, p. 348-352, 1995.

LEOPOLDINI, M.; PITARCH, I. P.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. **Journal of Physical Chemistry A,** v. 108, n. 1, p. 92-96, 2004.

LEVINE, M.; RAMSEY, S. C.; DARUWARA, R. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. **JAMA,** v. 281, n. 15, p. 1415-1423, 1991.

LI, L. P.; JIANG, H. D.; WU, H. H.; ZENG, S. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 37, n. 3, p. 615-620, 2005.

LIEBEL, F.; KAUR, S.; RUVOLO, E.; KOLLIAS, N.; SOUTHALL, M. D. Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 7, p. 1901-1907, 2012.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. INVITTOX Protocol No. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database, 1998. Last update October 2002. <http://ecvamsis.jrc.it/invittox/static/index.html>.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H.; PAPE, W.; KRUL, C.; DEGUERCY, A.; ESKES, C. UV-induced effects. **Alternatives to Laboratory Animals,** v. 33, Suppl 1, p. 131-146, 2005.

LIM, H. W.; DRAELOS, Z. D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection.** Inform Health Care USA, Inc. New York. 332 p., 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews,** v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LUE, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MAHMOUD, B. H.; HEXSEL, C. L.; HAMZAVI, T. H.; LIM, H. W. Effects of visible light on the skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 84, n. 2, p. 450-462, 2008.

MAHMOUD, B.H.; RUVOLO, E.; HEXSEL, C.L.; LIU, Y. OWEN, M.R.; KOLLIAS, N.; LIM, H.W. et al. Impact of long-wavelenght UVA and visible light on melanocompetent skin. **Journal of Investigative Dermatology,** v.130, p.2092-2097, 2010.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 117, n. 2, p. 256-262, 2001.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; MARTINCIGH, B. S.; BRUNNHOFER, K.; HONIGSMANN, H. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 21, p. 84-92, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais de Dermatologia,** v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARROT, L.; BELAIDI, J. P.; LEJEUNE, F.; MEUNIER, J. R.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. **British Journal of Dermatology,** v. 151, n. 6, p. 1234-1244, 2004.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (Matricaria recutita L.). **Phytotherapy Research,** v. 20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002. Supplement 1.

MICHAELI, A.; FEITELSON, J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. **Photochemistry and Photobiology,** v. 59, p. 284-289, 1994.

MILLER, N. J.; RICEEVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS (center dot+) radical cation assay. **Free Radical Research,** v. 26, n. 3, p. 195-199, 1997.

MORI, T.; MATSUNAGA, T.; HIROSE, T.; NIKAIDO, O. Establishment of a monoclonal-antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. **Mutation Research,** v. 194, n. 3, p. 263-270, 1988.

MORTENSEN, A. Scavenging of acetylperoxyl radicals and quenching of triplet diacetyl by beta-carotene: mechanisms and kinetics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 61, n. 1-2, p. 62-67, 2001.

NAGAI, S.; OHARA, K.; MUKAI, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 109, n. 9, p. 4234-4240, 2005.

NASH, J. F.; TANNER, P. R. Relevance of UV filter/ sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine,** v. 30, n. 2-3, p. 88-95, 2014.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research,** v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

NIELSEN, B. R.; JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Triplet-triplet extinction coefficients, rate constants of triplet decay and rate constants of anthracene triplet sensitization by laser flash photolysis of astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin in deaerated toluene at 298 K. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry,** v. 112, n. 2-3, p. 127-133, 1998.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances,** v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

OBA-SHINJO, S. M.; CORREA, M.; RICCA, T. I.; MOLOGNONI, F.; PINHAL, M. A.; NEVES, I. A.; MARIE, S. K. et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia,** v. 8, n. 3, p. 231-241, 2006.

OBERMULLER-JEVIC, U. C.; SCHLEGEL, B.; FLACCUS, A.; BIESALSKI, H. K. The effect of beta-carotene on the expression of interleukin-6 and heme oxygenase-1 in UV-irradiated human skin fibroblasts *in vitro*. **Febs Letters,** v. 509, n. 2, p. 186-190, 2001.

O'CONNOR, I.; O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **Journal of Dermatological Science,** v. 16, n. 3, p. 226-230, 1998.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test** (Original Guideline, adopted 13th April 2004). Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9743201e.pdf?expires=1466628972&id=id&accname=guest&checksum=D5FEB4E02B9ECBD98629087285DE907F>. Acesso em 01 jun. 2016.

ONOUE, S.; HOSOI, K.; TODA, T.; TAKAGI, H.; OSAKI, N.; MATSUMOTO, Y.; KAWAKAMI, S. et al. Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators. **Toxicology in Vitro,** v. 28, n. 4, p. 515-523, 2014.

ONOUE, S.; KAWAMURA, K.; IGARASHI, N.; ZHOU, Y.; FUJIKAWA, M.; YAMADA, H.; TSUDA, Y. et al. Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: Classification criteria and application to drug candidates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 47, n. 4-5, p. 967-972, 2008.

ONOUE, S.; TSUDA, Y. Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. **Pharmaceutical Research,** v. 23, n. 1, p. 156-164, 2006.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International,** v. 74, p. 10-36, 2015.

PARRISH, J. A.; JAENICKE, K. F.; ANDERSON, R. R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human-skin. **Photochemistry and Photobiology,** v. 36, n. 2, p. 187-191, 1982.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun-protective agents. In: FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F. 4. ed. **Dermatology in general medicine**. v. 1: New York: McGraw Hill, Inc., 1993, cap. 137, p. 1689–1716.

PELLATI, F.; PRENCIPE, F. P.; BERTELLI, D.; BENVENUTI, S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 81-82, p. 126-132, 2013.

PETERS, B.; HOLZHUTTER, H. G. *In vitro* phototoxicity testing: Development and validation of a new concentration response analysis software and biostatistical analyses related to the use of various prediction models. **Atla-Alternatives to Laboratory Animals,** v. 30, n. 4, p. 415-432, 2002.

PICHICHERO, E.; CICCONI, R.; MATTEI, M.; MUZI, M. G.; CANINI, A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. **International Journal of Oncology,** v. 37, n. 4, p. 973-981, 2010.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products,** v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology,** v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

PLONKA, P. M. Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. **Experimental Dermatology,** v. 18, n. 5, p. 472-484, 2009.

RANDHAWA, M.; SEO, I.; LIEBEL, F.; SOUTHALL, M. D.; KOLLIAS, N.; RUVOLO, E. Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response. **Plos One,** v. 10, n. 6, 2015.

REHDER, J.; SOUTO, L. R. M.; ISSA, C. M. B. M.; PUZZI, M. B. Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Medical Journal,** v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.

ROBERTS, W. G.; GORDON, M. H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, n. 5, p. 1486-1493, 2003.

RODRIGUES, D.; VIOTTO, A. C.; CHECCHIA, R.; GOMIDE, A.; SEVERINO, D.; ITRI, R.; BAPTISTA, M. S. et al. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 15, n. 3, p. 334-350, 2016.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Scavenging Capacity of Marine Carotenoids against Reactive Oxygen and Nitrogen Species in a Membrane-Mimicking System. **Marine Drugs,** v. 10, n. 8, p. 1784-1798, 2012.

ROMANHOLE, R. C.; ATAIDE, J. A.; MORIEL, P.; MAZZOLA, P. G. Update on ultraviolet A and B radiation generated by the sun and artificial lamps and their effects on skin. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 37, n. 4, p. 366-370, 2015.

ROTTIER, P. B.; VANDERLEUN, J. C. Hyperaemia of the deeper cutaneous vessels after irradiation of human skin with large doses of ultra-violet and visible light. **British Journal of Dermatology,** v. 72, n. 7, p. 256-260, 1960.

SACHDEVA, S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. **Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology,** v. 75, n. 1, p. 93-96, 2009.

SAINT-LEGER, D. The colour of the human skin: fruitful science, unsuitable wordings. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 37, n. 3, p. 259-265, 2015.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A. V.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; ZHAO, J. C. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 1, n. 12, p. 970-981, 2002.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical & Photobiological Sciences,** v. 9, n. 4, p. 464-469, 2010.

SHI, H. L.; NOGUCHI, N.; NIKI, E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol, against lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 27, n. 3-4, p. 334-346, 1999.

SIES, H.; MENCK, C. F. M. Singlet oxygen induced DNA damage. **Mutation Research,** v. 275, n. 3-6, p. 367-375, 1992.

SILVAN, S.; MANOHARAN, S.; BASKARAN, N.; ANUSUYA, C.; KARTHIKEYAN, S.; PRABHAKAR, M. M. Chemopreventive potential of apigenin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis. **European Journal of Pharmacology,** v. 670, n. 2-3, p. 571-577, 2011.

SIM, G.-S.; LEE, B.-C.; CHO, H.S.; LEE, J.W.; KIM, J.-H.; LEE, D.-H.; KIM, J.-H.; PYO, H.-B.; MOON, D.C.; OH, K.-W.; YUN, Y.P.; HONG, J.T. Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. **Archives of Pharmacal Research,** v. 30, n. 3, p. 290-298, 2007.

SIMIS, T.; SIMIS, D. R. C. Doenças da Pele Relacionadas à Radiação Solar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 8, n.1, p.1-8, 2006.

SIMON, J. D.; PELES, D. N. The Red and the Black. **Accounts of Chemical Research,** v. 43, n. 11, p. 1452-1460, 2010.

SIMON, J. D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell & Melanoma Research,** v. 22, n. 5, p. 563-579, 2009.

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 & Photobiological Sciences,** v. 12, n. 1, p. 54-64, 2013.

STEENVOORDEN, D. P. T.; VAN HENEGOUWEN, G. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 41, n. 1-2, p. 1-10, 1997.

SUWANNATEEP, N.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.; HAAG, S. F.; DEVAHASTIN, S.; GROTH, N.; FLUHR, J. W.; LADEMANN, J. et al. Encapsulated curcumin results in prolonged curcumin activity *in vitro* and radical scavenging activity *ex vivo* on skin after UVB-irradiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 82, n. 3, p. 485-490, 2012.

SUZUKAWA, A. A.; VIEIRA, A.; BROCHADO WINNISCHOFER, S. M.; SCALFO, A. C.; DI MASCIO, P.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; RAVANAT, J.-L. et al. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 52, n. 9, p. 1945-1953, 2012.

TADA, M.; KOHNO, M.; NIWANO, Y. Scavenging or Quenching Effect of Melanin on Superoxide Anion and Singlet Oxygen. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition,** v. 46, n. 3, p. 224-228, 2010.

TADOKORO, T.; KOBAYASHI, N.; ZMUDZKA, B. Z.; ITO, S.; WAKAMATSU, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOROSSY, K. S. et al. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. **Faseb Journal,** v. 17, n. 6, p. 1177-1179, 2003.

TAKEUCHI, S.; ZHANG, W. G.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; HEARING, V. J.; KRAEMER, K. H.; BRASH, D. E. Melanin acts as a cause an atypical potent UVB photosensitizer to mode of cell death in murine skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 101, n. 42, p. 15076-15081, 2004.

TEDESCO, A. C.; MARTINEZ, L.; GONZALEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: Defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 30, n. 5, p. 561-575, 1997.

TERAO, J.; MINAMI, Y.; BANDO, N. Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition,** v. 48, n. 1, p. 57-62, 2011.

TOFFOLETTI, A.; CONTI, F.; SANDRON, T.; NAPOLITANO, A.; PANZELLA, L.; D'ISCHIA, M. Time-resolved EPR observation of synthetic eumelanin-superoxide radical pairs. **Chemical Communications**, n. 33, p. 4977-4979, 2009.

TSUJI, P.A.; WALLE, T. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 37–44, 2008.

TYRREL, R. M. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. **Molecular Aspects of Medicine,** v. 15, n. 1, p. 1-77, 1994.

UCHOA, A. F.; KNOX, P. P.; TURCHIELLE, R.; SEIFULLINA, N. K.; BAPTISTA, M. S. Singlet oxygen generation in the reaction centers of Rhodobacter sphaeroides. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 37, n. 6, p. 843-850, 2008.

UMLAS, M. E.; FRANKLIN, W. A.; CHAN, G. L.; HASELTINE, W. A. Ultraviolet-light irradiation of defined-sequence DNA under conditions of chemical photosensitization. **Photochemistry and Photobiology,** v. 42, n. 3, p. 265-273, 1985.

UYEN, L. D. P.; NGUYEN, D. H.; KIM, E.-K. Mechanism of skin pigmentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 13, n. 4, p. 383-395, 2008.

VANDERSEE, S.; BEYER, M.; LADEMANN, J.; DARVIN, M. E. Blue-Violet Light Irradiation Dose Dependently Decreases Carotenoids in Human Skin, Which Indicates the Generation of Free Radicals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

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**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VILLELA, A.; VAN DER KLIFT, E. J. C.; MATTHEUSSENS, E. S. G. M.; DERKSEN, G. C. H.; ZUILHOF, H.; VAN BEEK, T. A. Fast chromatographic separation for the quantitation of the main flavone dyes in Reseda luteola (weld). **Journal of Chromatography A,** v. 1218, n. 47, p. 8544-8550, 2011.

WEINSTEIN, J. N.; YOSHIKAMI, S.; HENKART, P.; BLUMENTHAL, R.; HAGINS, W. A. Liposome-cell interaction - transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. **Science,** v. 195, n. 4277, p. 489-492, 1977.

WERTZ, P. W. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Dermato-Venereologica**, p. 7-11, 2000.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POOR, I.; NADERI, L.; MA, W. J.; SCHNEIDER, A.; RAZI-WOLF, Z.; SCHULLER, J. et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 63, n. 1-3, p. 41-51, 2001.

WU, N.-L.; FANG, J.-Y.; CHEN, M.; WU, C.-J.; HUANG, C.-C.; HUNG, C.-F. Chrysin Protects Epidermal Keratinocytes from UVA- and UVB-Induced Damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 59, n. 15, p. 8391-8400, 2011.

YADAV, A. K.; MANIKA, N.; BAGCHI, G. D.; GUPTA, M. M. Simultaneous determination of flavonoids in Oroxylum indicum by RP-HPLC. **Medicinal Chemistry Research,** v. 22, n. 5, p. 2222-2227, 2013.

YANISHLIEVA, N. V.; AITZETMULLER, K.; RANEVA, V. G. Beta-carotene and lipid oxidation. **Fett-Lipid,** v. 100, n. 10, p. 444-462, 1998.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 269, n. 1, p. 131-136, 2000.

YE, Y.; CHOU, G.-X.; WANG, H.; CHU, J.-H.; YU, Z.-L. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. **Phytomedicine,** v. 18, n. 1, p. 32-35, 2010.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology,** v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

ZASTROW, L.; GROTH, N.; KLEIN, F.; KOCKOTT, D.; LADEMANN, J.; RENNEBERG, R.; FERRERO, L. The Missing Link - Light-Induced (280-1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin. **Skin Pharmacology and Physiology,** v. 22, n. 1, p. 31-44, 2009.

ZONIOS, G.; DIMOU, A.; BASSUKAS, I.; GALARIS, D.; TSOLAKIDIS, A.; KAXIRAS, E. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection. **Journal of Biomedical Optics,** v. 13, n. 1, 2008.

ZUNINI, M. P.; ROJAS, C.; DE PAULA, S.; ELINGOLD, I.; MIGLIARO, E. A.; CASANOVA, M. B.; RESTUCCIA, F. I. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society,** v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.