UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da performance de formulações fotoprotetoras
associadas a mangiferina e naringenina: fotoestabilidade e
fototoxicidade**

Camila Martins Kawakami

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da performance de formulações fotoprotetoras
associadas a mangiferina e naringenina: fotoestabilidade e
fototoxicidade**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Camila Martins Kawakami

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

Ribeirão Preto

2015

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.

Kawakami, Camila Martins

Avaliação da performance de formulações fotoprotetoras associadas a mangiferina e naringenina: fotoestabilidade e fototoxicidade . Ribeirão Preto, 2015.

121 p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar

1. Filtros solares.
2. Mangiferina.
3. Naringenina.
4. Fotoestabilidade.
5. Fototoxicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Camila Martins Kawakami

Título do trabalho: Avaliação da performance de formulações fotoprotetoras associadas a mangiferina e naringenina: fotoestabilidade e fototoxicidade

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A **Deus**, por atender minhas preces e iluminar meus passos ao longo dessa caminhada.

Aos meus amados pais **Cláudia** e **Kogi**, por todo amor, incentivo e por nunca medirem esforços para que eu consiga realizar meus sonhos.

À minha irmã **Kelly**, pelo companheirismo e pelos momentos tão especiais que compartilhamos juntas.

À minha querida avó **Dulce**, pelo amor, dedicação e pelas orações.

A todos os meus **amigos** e **familiares** pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu namorado **Felipe**, meu grande companheiro nessa jornada, pelo carinho, incentivo e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado! Também à toda sua família, pelo acolhimento e pelos conselhos nessa etapa tão importante.

Agradecimento especial

À minha orientadora Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, não só pela constante orientação nesse trabalho, mas, sobretudo, pela sua dedicação, amizade e pelo apoio em todas as horas.

Agradecimentos

À querida **Renata**, pela amizade, pelos conselhos e entusiasmo, que foram essenciais para a realização desse trabalho.

À **Carolina**, por toda sua dedicação, presença constante e incansável solicitude em vários momentos.

À **Juliana**, pela amizade, e por toda ajuda prestada em diversas atividades.

À **Karina**, pelo apoio nos experimentos e pelos momentos de descontração que compartilhamos juntas.

À minha amiga **Fran**, pela amizade sincera, pelas conversas, companheirismo e imenso apoio prestado na realização desse trabalho.

À professora **Dr. Renata Fonseca Vianna Lopez**, que gentilmente cedeu o cromatógrafo para realização dos experimentos de fotoestabilidade.

À professora **Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal**, pela concessão do uso de alguns equipamentos para a realização dos experimentos de fototoxicidade.

À professora **Dra. Lúcia Helena Faccioli**, pela concessão do uso do leitor de microplacas para a realização dos experimentos de fototoxicidade.

Ao professor **Dr. Roberto Santana da Silva**, pela concessão do espectrofotômetro para realização dos experimentos de fotoestabilidade durante a realização desse trabalho.

A todos os **professores** que, em algum momento, gentilmente cederam algum material ou equipamento para a realização desse trabalho, ou ofereceram sugestão sobre a pesquisa.

Aos professores **Dra. Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos, Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, Dra. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal**, pelas correções e sugestões feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

Aos técnicos **Patrícia, Juliana, Júnior, Perpétua** e a todos que de alguma forma, ajudaram na 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.

A todos os **professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que contribuíram para minha formação.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A **todos** que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, à **CAPES** e ao **CNPQ**, pelo apoio financeiro.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

RESUMO

KAWAKAMI, C. M. **Avaliação da performance de formulações fotoprotetoras associadas a mangiferina e naringenina: fotoestabilidade e fototoxicidade.** 2015. 121 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Atualmente, devido ao conhecimento dos danos causados pela exposição da pele à radiação UV, existe uma tendência em utilizar, além dos filtros solares convencionais, substâncias naturais com potencial antioxidante. Entretanto, o uso de associações fotoinstáveis, pode, além de comprometer a capacidade fotoprotetora, levar à formação de intermediários reativos que podem ocasionar dermatites de contato e reações fototóxicas na pele. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fotoestabilidade e fototoxicidade de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares acrescidas ou não dos polifenóis mangiferina e naringenina. Para o estudo de fotoestabilidade, amostras das formulações foram aplicadas em lâminas de vidro e expostas à radiação UVA e, a seguir, foram feitas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para dosagem do teor de filtros solares e antioxidantes, e por espectrofotometria, para determinação da razão UVA/UVB. A fototoxicidade foi avaliada por meio do uso de cultura de fibroblastos 3T3, submetida ou não à radiação UVA, para determinação da viabilidade celular. Os resultados de fotoestabilidade por CLAE demonstraram que a naringenina, o metoxicinamato de etilexila e avobenzona foram considerados fotoinstáveis. Além disso, foi demonstrado que a adição de mangiferina à associação contendo avobenzona e naringenina, proporcionou um aumento da fotoestabilidade das mesmas. A presença do dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB) na formulação contendo avobenzona e naringenina promoveu melhora da fotoestabilidade da naringenina, no entanto não houve melhora da fotoestabilidade da avobenzona. As análises espectrofotométricas demonstraram que as formulações contendo a associação de avobenzona e DHHB (associação 3) apresentaram uma proteção no UVA superior às demais associações, ou seja, que continham avobenzona e DHHB isoladamente. O estudo de fototoxicidade mostrou que a avobenzona e o DHHB apresentaram potencial fototóxico. Quando as associações de filtros solares e antioxidantes foram analisadas, foi observado que a associação de avobenzona e naringenina, combinada ou não ao DHHB, apresentou potencial fototóxico. Dessa forma, esta não é recomendada para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras. A associação DHHB / avobenzona, por apresentar elevada proteção UVA, pode ser vantajosa para o desenvolvimento de fotoprotetores, entretanto a sua associação com antioxidantes deve ser utilizada com cautela e analisada caso a caso. A naringenina não é indicada para fotoprotetores contendo avobenzona, uma vez que esta associação foi considerada fotoinstável e fototóxica. Já a utilização da mangiferina pode ser considerada mais segura, e, além disso, a sua elevada atividade antioxidante pode complementar a eficácia de fotoprotetores.

Palavras-chave: Filtros solares, mangiferina, naringenina, fotoestabilidade, fototoxicidade

ABSTRACT

KAWAKAMI, C. M. **Performance of photoprotective formulations containing mangiferin and naringenin: photostability and phototoxicity evaluation.** 2015. 121 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nowadays, due to the knowledge of UV-induced skin damage, there is a tendency to use natural substances with antioxidant potential, beyond conventional UV-filters. However, the use of photounstable combinations can compromise the photoprotective capacity and lead to formation of reactive intermediates that can cause contact dermatitis and phototoxic skin reactions. Thus, the objective of this study was to evaluate the photostability and phototoxicity of sunscreen formulations containing different UV-filter combinations supplemented or not with the polyphenols mangiferin and naringenin. For photostability studies, samples of the formulations were spread onto glass plates, exposed to UVA radiation and then analyzed by HPLC to determine the UV-filters and antioxidants concentrations, and also by spectrophotometry to determine the UVA/UVB ratio. Phototoxicity was evaluated by using the 3T3 fibroblast cultures, which was exposed to UVA radiation for the determination of cell viability. The results of photostability by HPLC analysis showed that naringenin, ethylhexyl methoxycinnamate and avobenzone were considered photounstable. Furthermore, it was demonstrated that the addition of mangiferin combined with avobenzone and naringenin, provided an increase in their photostability. The presence of DHHB in the formulation containing avobenzone and naringenin promoted an improvement in naringenin photostability, what was not observed for avobenzone. The spectrophotometric analysis showed that the formulations containing the combination of avobenzone and DHHB (combination 3) presented higher protection against UVA than the other combinations, i.e. the combinations containing avobenzone and DHHB, separately. The phototoxicity study showed that avobenzone and DHHB presented phototoxic potential. When UV-filters and antioxidants combinations were analyzed, it was observed that the combination of avobenzone and naringenin, combined or not with DHHB, presented phototoxic potential. Therefore, this is not recommended for the development of sunscreens. The combination DHHB / avobenzone, due to its high UVA protection, may be suitable on the development of sunscreens, however its combination with antioxidants should be used with caution and analyzed case-by-case. Naringenin is not indicated for sunscreens containing avobenzone, since this combination was considered photounstable and phototoxic. Moreover, the use of mangiferin can be considered safer than naringenin and, besides that, its high antioxidant activity can improve the photoprotective effects of sunscreens.

Keywords: Sunscreens, mangiferin, naringenin, photostability, phototoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mecanismo da deslocalização eletrônica do PABA	12
Figura 2-	Mecanismo de deslocalização eletrônica dos salicilatos.....	12
Figura 3-	Mecanismo de deslocalização eletrônica dos cinamatos.....	13
Figura 4-	Mecanismo de deslocalização eletrônica da benzofenona	13
Figura 5-	Estrutura molecular do 4-metilbenzilideno cânfora	14
Figura 6-	Estrutura molecular do octocrileno	14
Figura 7-	Tautomerismo ceto-enólico sofrido pela avobenzona	15
Figura 8-	Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona.....	15
Figura 9-	Fragmentação da avobenzona em radical fenacil (a) e radical benzoil (b), sendo R1= OCH ₃ E R2= C(CH ₃) ₃	16
Figura 10-	Estrutura molecular do DHHB	16
Figura 11-	Estrutura molecular da mangiferina	18
Figura 12-	Estrutura molecular da naringenina	19
Figura 13-	Diagrama de Jablonski. Abreviações: S0: estado fundamental, S1: estado excitado singleto, T1: estado excitado tripleto, ISC: conversão intersistemas, FL: fluorescência, FO: fosforescência	23
Figura 14-	Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade. B= branco, contendo DPBS (não contém células, porém tratada com vermelho neutro e solução de dessorção). CNT= controle não tratado (contém células, porém não contém nenhuma substância em estudo)	42
Figura 15-	Curva analítica da mangiferina.....	47
Figura 16-	Curva analítica da naringenina.....	47
Figura 17-	Curva analítica do DHHB	48
Figura 18-	Curva analítica do octocrileno	48
Figura 19-	Curva analítica do metoxicinamato de etilexila	49

Figura 20-	Curva analítica da avobenzona.....	49
Figura 21-	Perfil cromatográfico dos padrões das substâncias em estudo. (A): Mangiferina (MGF), (B): Naringenina (NRG), (C): Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), (D): Octocrileno (OCT), (E): Metoxicinamato de etilexila (MTX), (F): Avobenzona (AVO). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol: água com 2% de ácido acético, fluxo de 0,8mL.min ⁻¹ ; coluna de fase reversa C18 (5µm), 250mm x 4mm; detecção 325 nm.....	50
Figura 22-	Perfil cromatográfico do branco de reagente, ou seja, metanol (A) , da extração do veículo (formulação sem nenhum filtro solar ou antioxidante) (B) e dos filtros solares e antioxidantes em solução de metanol (C) . Picos: Mangiferina (MGF), Naringenina (NRG), Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), Octocrileno (OCT), Metoxicinamato de etilexila (MTX) e Avobenzona (AVO).....	51
Figura 23-	Cromatogramas da formulação FB1 quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).....	53
Figura 24-	Cromatogramas da formulação FB1M quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: mangiferina (MGF), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).....	54
Figura 25-	Cromatogramas da formulação FB1N quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: naringenina (NRG), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).....	55
Figura 26-	Cromatogramas da formulação FB1MN quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).....	56
Figura 27-	Cromatogramas da formulação FB2 quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX)	57
Figura 28-	Cromatogramas da formulação FB2M quando submetida (A) ou não à irradiação (B) . Picos: mangiferina (MGF), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX)	58

- Figura 29-** Cromatogramas da formulação FB2N quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX) 59
- Figura 30-** Cromatogramas da formulação FB2MN quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX) 60
- Figura 31-** Cromatogramas da formulação FB3 quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO)..... 61
- Figura 32-** Cromatogramas da formulação FB3M quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO)..... 62
- Figura 33-** Cromatogramas da formulação FB3N quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO)..... 63
- Figura 34-** Cromatogramas da formulação FB3MN quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO)..... 64
- Figura 35-** Porcentagem remanescente da mangiferina **(A)** e naringenina **(B)** nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão) 76
- Figura 36-** Porcentagem remanescente do DHHB **(A)** e octocrileno **(B)** nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FB), filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão)..... 77

- Figura 37-** Porcentagem remanescente da metoxicinamato de etilexila **(A)** e avobenzona **(B)** nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FB), filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão) 78
- Figura 38-** Espectro de varredura no UV (290-400 nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo as associações 1, 2 e 3 de filtros solares **(A)**: Formulações FB, ou seja, contendo apenas os filtros solares. **(B)**: Formulações FBM, ou seja, contendo filtros solares e mangiferina..... 80
- Figura 39-** Espectro de varredura no UV (290-400 nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo as associações 1, 2 e 3 de filtros solares **(A)**: Formulações FBN, ou seja, contendo filtros solares e naringenina. **(B)**: Formulações FBMN, ou seja, contendo filtros solares, mangiferina e naringenina 81
- Figura 40-** Razão UVA/UVB de todas as formulações em estudo, irradiadas (barra com textura) e não irradiadas, contendo: filtros solares (FB), filtros solares e mangiferina (FBM), filtros solares e naringenina (FBN) e filtros solares e mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão) 84
- Figura 41-** Curvas dose-resposta das substâncias em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.)..... 87
- Figura 42-** Curvas dose-resposta das associações em estudo classificadas como fototóxicas e não fototóxicas (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.)..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sistema <i>Boot's Star Rating</i> relacionado com a razão UVA/UVB	21
Tabela 2-	Composição das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade (% p/p).....	34
Tabela 3-	Composição das formulações submetidas ao estudo de fotoestabilidade (% p/p)	35
Tabela 4-	Valores de pH das formulações submetidas ao teste preliminar de estabilidade	46
Tabela 5-	Precisão e exatidão intra e inter-ensaio. MGF: mangiferina; NRG: naringenina; DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato; OCT: octocrileno; MTX: metoxicinamato de etilexila; AVO: avobenzona	52
Tabela 6-	Concentração remanescente da mangiferina	65
Tabela 7-	Concentração remanescente da naringenina	66
Tabela 8-	Concentração do DHHB.....	67
Tabela 9-	Concentração remanescente do octocrileno.....	69
Tabela 10-	Concentração remanescente do metoxicinamato de etilexila	71
Tabela 11-	Concentração remanescente da avobenzona.....	73
Tabela 12-	Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação	82
Tabela 13-	Sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA.....	85
Tabela 14-	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N=2)	86
Tabela 15-	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo, em cultura de fibroblastos (N=2).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros
³ AVO ^K	Avobenzona no estado excitado tripleto
3R's	<i>Refine, Reduction and Replacement</i>
3T3 NRU PU	Teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
6,4 PP	Fotoproducto (6-4)- pirimidina-pirimidona
A	Associação
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
AVO	Avobenzona
AVO ^E	Avobenzona na forma enólica
AVO ^K	Avobenzona na forma cetona
B	Branco
BHT	Butil- hidroxitolueno
C	Concentração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
CMD	Concentração média determinada
CNT	Controle não tratado
CPD	Dímeros de ciclobutano pirimidinas
CV	Coeficiente de variação
DEc	Efeito dose
DHNB	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato
dm	Decímetro
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPBS	Dulbeccos's Phosphate-Buffered Saline
DPR	Desvio padrão relativo
E	Exatidão
EC50	Concentração de uma substância que inibe 50% da viabilidade celular
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EROs	Espécies reativas do oxigênio
F	Formulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fluorescência
FO	Fosforescência
FPS	Fator de proteção solar
HPLC	High- Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
ICS	Conversão intersistemas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	International Union of Pure and Applied Chemistry
INN	International Nonproprietary Names
J	Joules
kJ	Kilojoules
m	Metros
MGF	Mangiferina
min	Minutos

mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP-9	Metaloproteinase- 9
MMPs	Metaloproteinases
MPE	Mean photo effect
MTX	Metoxicinamato de etilexila
mW	Miliwatts
ND	Não determinável
nm	Nanômetros
NRG	Naringenina
°C	Graus Célcus
OCT	Octocrileno
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
p/p	Peso/peso
p53	Gene supressor de tumor p53
PA	Para análise
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PEci	Foto efeito
pH	Potencial hidrogeniônico
PIF	<i>Photo irritation factor</i>
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i>
r	Coeficiente de correlação
R1	Radical 1
R2	Radical 2

Rc	Resposta
REc	Efeito resposta
RPM	Rotações por minuto
S1	Estado excitado singleto
SO	Estado fundamental eletrônico
T1	Estado excitado tripleto
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
W	Watts

LISTA DE SÍMBOLOS

TM	Trademark
®	Marca registrada
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
ϵ	Coeficiente de absortividade molar
E	Isômero <i>trans</i>
Z	Isômero <i>cis</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singleto
•OH	Radical hidroxil
O ₂ • ⁻	Radical superóxido
ROO•	Radical peroxil
RO•	Radical alcoxil
CO ₂	Gás carbônico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
Lista de símbolos	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. A pele e radiação UV	7
2.2. Fotoproteção	10
2.2.1. Filtros solares	10
2.2.2. Antioxidantes.....	17
2.2.2.1. Mangiferina.....	18
2.2.2.2. Naringenina	19
2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores.....	20
2.3.1. Eficácia.....	20
2.3.2. Fotoestabilidade	21
2.3.3. Segurança	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28

4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Materiais.....	30
4.1.1. Matérias-primas e reagentes.....	30
4.1.2. Equipamentos e acessórios	31
4.2. Métodos.....	33
4.2.1. Elaboração das formulações	33
4.2.2. Testes preliminares de estabilidade	36
4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores	36
4.2.3.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo	36
4.2.3.2. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
4.2.3.2.1. Linearidade.....	38
4.2.3.2.2. Seletividade.....	38
4.2.3.2.3. Precisão e exatidão	38
4.2.3.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV.....	39
4.2.3.4. Análise estatística	39
4.2.4. Avaliação da fototoxicidade.....	40
4.2.4.1. Linhagem celular de fibroblastos 3T3.....	40
4.2.4.2. Fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)	40
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Testes preliminares de estabilidade	45
5.2. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes	46
5.2.1. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por CLAE.....	46
5.2.1.1. Padronização do método de CLAE	46
5.2.1.1.1. Linearidade.....	46
5.2.1.1.2. Seletividade.....	50

5.2.1.1.3. Precisão e exatidão	52
5.2.1.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e antioxidantes por CLAE.....	52
5.2.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV.....	79
5.3. Avaliação da fototoxicidade	84
5.3.1. Análise das substâncias isoladas.....	85
5.3.2. Análise das associações das substâncias em estudo	88
6. DISCUSSÃO.....	91
7. CONCLUSÕES.....	106
8. REFERÊNCIAS.....	109

1. Introdução

Atualmente, sabe-se que a exposição aguda e crônica à radiação ultravioleta (UV) é responsável por provocar inúmeros danos biológicos à pele, incluindo queimaduras solares, reações inflamatórias, imunossupressão, fotoenvelhecimento e câncer de pele, sendo este último o de maior relevância clínica (VELASCO et al., 2008; PERIOLI et al., 2006). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que para o biênio 2014/2015 haverá 5.890 novos casos de câncer de pele melanoma/ano e 182.130 novos casos de não melanoma/ano, o que o mantém como o câncer de maior incidência na população brasileira (INCA, 2014).

A aplicação regular de filtros solares constitui umas das principais medidas para a prevenção/atenuação dos danos induzidos pela radiação UV (KOCKLER et al., 2012). No entanto, muitos aspectos devem ser considerados na elaboração de um fotoprotetor seguro e eficaz, tal como o uso de combinações de filtros solares que proporcionem um amplo espectro de proteção frente à radiação UV, e reduzida concentração dos mesmos, no sentido de se evitar possíveis irritações cutâneas e alérgicas (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Além disso, é também desejável que os fotoprotetores contenham uma associação de filtros solares fotoestável, ou seja, que não sofra alterações estruturais irreversíveis durante o período de exposição ao UV (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006; KOCKLER et al., 2012). A fotodegradação dos filtros solares pode resultar na perda da eficácia fotoprotetora, por meio da diminuição da capacidade de absorver a radiação UV e também levar à formação fotoprodutos reativos, os quais podem desencadear sensibilização cutânea, fotoalergia e reações fototóxicas na pele, bem como eventos genotóxicos e fotoenvelhecimento (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; CHATELAIN; GABARD, 2001; KARLSSON et al., 2009; MARROT et al., 2004).

Dentre os filtros solares mais utilizados mundialmente, pode-se citar o metoxicinamato de etilexila, que confere alta proteção UVB, com absorção máxima em 310 nm. Entretanto, esse composto está sujeito a sofrer fotoisomerização *cis-trans*. Enquanto o isômero *E* é predominante e apresenta um elevado coeficiente de absorvidade molar, o isômero *Z*, formado na presença de luz, apresenta coeficiente de absorvidade molar bem inferior, o que leva à redução da absorção UVB (SHAATH, 2010; KOCKLER et al., 2012).

Apesar de existir no mercado um grande número de moléculas capazes de absorver na região do UVB, os filtros solares que absorvem no UVA são limitados,

sendo que a avobenzona (AVO) é o mais utilizado. No entanto, apresenta fotoinstabilidade e está sujeito a reações de tautomerização, fragmentação e formação de fotoprodutos quando exposto à radiação UV, o que pode resultar na perda de sua eficácia fotoprotetora (DAMIANI et al., 2006; PARIS et al., 2009; SCHWACK; RUDOLPH, 1995).

Nesse contexto, tem-se observado a grande necessidade em se buscar novos filtros solares que possuam um amplo espectro de ação, tanto no UVA quanto no UVB, bem como de novas matérias-primas, denominadas de fotoestabilizadores, que aumentem a fotoestabilidade dos mesmos, principalmente da avobenzona. O octocrileno (OCT) é um filtro UVB, que além de contribuir para o aumento do fator de proteção solar (FPS) de formulações, ajuda a promover a fotoestabilização de alguns filtros solares, como a avobenzona (SHAATH, 2010; NASH, 2006).

Já o dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB) é um filtro solar que foi introduzido no mercado em 2005 (SOBANSKA; BRZEZINSKA, 2011) com o propósito de se tornar o sucessor da avobenzona, uma vez que possui alto desempenho na região UVA, com absorção máxima em 354 nm, mas com a particularidade de apresentar fotoestabilidade muito superior (LHIAUBET-VALLET et al., 2010; KOCKLER et al., 2012; PUGLIA et al., 2014).

Atualmente, devido ao conhecimento de que a exposição à radiação UV desempenha um papel fundamental no desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante endógeno, observa-se uma forte tendência em utilizar nas formulações fotoprotetoras substâncias de origem natural, como os polifenóis, que em associação aos filtros solares convencionais, podem proporcionar um efeito sinérgico na prevenção contra os danos provocados pela radiação UV (ADHAMI et al., 2008; TOLLESON et al., 2005; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007).

Nesse sentido, os polifenóis mangiferina e naringenina constituem alternativas promissoras para serem utilizadas como agentes fotoprotetores, tendo em vista suas elevadas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante.

A mangiferina (MGF) é um dos constituintes fenólicos majoritários da espécie vegetal *Mangifera indica*, conhecida popularmente como manga, e pode ser detectada em suas folhas, caule, frutos e raízes (CANUTO et al., 2009). Esse composto tem atraído interesse devido as suas diversas propriedades farmacológicas tais como, antioxidante, antitumoral, antiviral, antidiabética e

imunomodulatória (CANUTO et al., 2009; DAS et al., 2012). De acordo com estudos realizados por Das e colaboradores (2012), a mangiferina é capaz de modular a expressão de genes responsáveis pela regulação da apoptose e inflamação. Além disso, possui efeitos inibitórios na ativação do fator de transcrição NF- κ B e de citocinas pró-inflamatórias. Segundo Petrova e colaboradores (2011) a mangiferina conferiu elevada atividade antioxidante *in vitro* e promoveu diminuição dos danos oxidativos *in vivo* induzidos pela radiação UVB.

A naringenina (NRG) é amplamente encontrada em vegetais, especialmente em frutas cítricas, como a toranja (*grapefruit*). Essa substância possui propriedades antioxidantes e antiproliferativas em linhagens celulares de câncer de cólon (COLLINS et al., 2011). Possui efeitos protetores contra a peroxidação lipídica, a qual está envolvida em diversas desordens patológicas e fisiológicas, como envelhecimento, inflamação, aterosclerose, isquemia (LI et al., 2008). Segundo El-Mahdy e colaboradores (2008) a naringenina demonstrou ser capaz de prevenir os efeitos deletérios causados pela exposição à radiação UVB por meio da remoção de dímeros de ciclobutano pirimidinas e inibição da apoptose em queratinócitos humanos.

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, o potencial fotoprotetor da mangiferina e naringenina foi avaliado por meio da análise da absorção no UV, fotoestabilidade e fototoxicidade. A mangiferina apresentou alta absorção na região do UVA, com picos de absorção em 320 e 368 nm e a naringenina apresentou alta absorção no UVB, com pico máximo de absorção em 292 nm. Nos estudos de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV, mangiferina e naringenina foram consideradas fotoestáveis, uma vez que as amostras submetidas à radiação UV foram consideradas estatisticamente iguais ao seu par não irradiado. Já os estudos de fototoxicidade demonstraram que a mangiferina e naringenina não apresentam potencial fototóxico (KAWAKAMI et al., 2013). Assim, os polifenóis mangiferina e naringenina de acordo com a literatura e com resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, podem ser considerados bons candidatos a filtros solares biológicos.

Além da fotoestabilidade, outros estudos que levem em consideração a segurança dos produtos cosméticos devem ser realizados. Em decorrência da redução dos testes envolvendo animais de experimentação para a avaliação da segurança de produtos cosméticos na Europa, o que culminou em sua proibição

total em março de 2013, muitos métodos alternativos ao uso de animais de experimentação vêm sendo desenvolvidos e têm se tornado uma tendência mundial à avaliação de ingredientes e produtos.

Um dos testes que foram cientificamente validados é o teste de fototoxicidade 3T3 NRU PT, que consiste na avaliação da viabilidade das células tratadas com a substância química a ser analisada, quando submetidas ou não à irradiação UVA, para posterior determinação da fototoxicidade e citotoxicidade (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998; LIEBSCH et al., 2005). Este teste identifica o potencial fototóxico de substâncias com uma elevada sensibilidade e especificidade. Dessa forma, se uma substância não apresentar potencial fototóxico em cultura de fibroblastos, não apresentará fototoxicidade *in vivo*, e, portanto, não haverá necessidade da realização de testes subsequentes (KEJLOVÁ et al., 2007; JIROVÁ et al., 2008).

Vários estudos publicados vêm demonstrando as propriedades biológicas dos polifenóis mangiferina e naringenina, o que os tornam substâncias promissoras para serem utilizadas em formulações fotoprotetoras. Entretanto, não há nenhuma informação em relação à fotoestabilidade e fototoxicidade desses compostos quando associados aos filtros solares convencionais, o que justifica a importância da realização desses estudos para obtenção de dados em relação à segurança e eficácia.

2.Revisão Bibliográfica

2.1. A pele e radiação UV

A pele constitui uma interface do corpo humano com o meio externo, desempenhando funções essenciais para o organismo. Age como uma barreira de proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos, é capaz de regular a temperatura corporal e a perda de água pelo corpo e apresenta propriedades sensoriais, uma vez que possui diversos receptores para tato, pressão e dor. Além disso, apresenta funções metabólicas, como excreção de sais e síntese de vitamina D e participa do sistema imunológico (CHUONG et al., 2002; HALLER, 1989).

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, sendo que apresenta uma área de superfície de aproximadamente 1,7 m² no indivíduo adulto, o que corresponde cerca de 12% do peso corporal. As três camadas que constituem a pele são a epiderme, a derme e a hipoderme (GOLDSMITH, 1990; IOBST; SANTHANAM; WEINKAUF, 2006).

A epiderme é constituída por um epitélio pavimentoso queratinizado, que apresenta quatro tipos celulares: queratinócitos (em maior população), melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A estrutura da epiderme consiste de um grupo de células vivas denominada epiderme viável e de um conjunto de células mortas que formam o estrato córneo (CHUONG et al., 2002; MENON et al., 2002). A epiderme viável é constituída de células metabolicamente ativas que formam outras 4 camadas distintas: basal, espinhosa, granulosa e lúcida (CHUONG, et al., 2002).

A camada basal é a mais profunda da epiderme, sendo constituída por uma única camada de células cúbicas mitoticamente ativas. Essas células, recém-produzidas, migram em direção a superfície da pele e passam por processo denominado de queratinização ou corneificação, que dá origem a camada córnea, constituída por células mortas, anucleadas e composta basicamente de queratina, uma proteína responsável pela impermeabilização da pele (MENON et al., 2002; EDWARDS; MARKS, 1995). A renovação constante da epiderme faz com que as células do estrato córneo sejam gradativamente eliminadas e substituídas por novas (IOBST; SANTHANAM; WEINKAUF, 2006).

A camada espinhosa é a região onde se inicia o processo de queratinização. As células dessa camada estão unidas entre si e às células basais adjacentes por meio de pontes intercelulares denominadas desmossomos, estruturas complexas que conferem à pele resistência a traumas mecânicos (EDWARDS; MARKS, 1995).

As células da camada granulosa são repletas de grânulos de querato-hialina e grânulos lamelares, que por sua vez constituem uma barreira contra a penetração de substâncias e tornam a pele impermeável à água (MENON et al., 2002). A camada lúcida é uma camada muito fina de células achatadas, mortas e sem núcleo, podendo ser encontrada somente nas regiões onde a camada córnea é espessa (GASSER et al., 2004).

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme que, por sua vez, é constituída por um tecido conjuntivo denso (fibras colágenas e elásticas envoltas por uma substância fundamental), vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e terminações nervosas. Os elementos celulares deste tecido são os fibroblastos (responsáveis pela síntese de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos), mastócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. A principal função da derme é conferir resistência e elasticidade à pele (MENON et al., 2002; HOLBROOK; WOLFF, 1993).

Já a hipoderme é a camada mais profunda da pele e está organizada em lóbulos de gordura divididos por septos fibrosos compostos de colágeno, por onde correm vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Suas principais funções são absorver choques e atuar como isolante térmico (IOBST; SANTHANAM; WEINKAUF, 2006).

A radiação ultravioleta (UV) corresponde a uma pequena parcela do espectro eletromagnético que atinge a Terra (cerca de 5%), no entanto, é a principal responsável por induzir danos à pele. Essa radiação compreende os comprimentos de onda entre 200 a 400 nm, sendo que as faixas de 290-320 nm e 320-400 nm correspondem, respectivamente, às radiações ultravioleta B (UVB) e ultravioleta A (UVA). A radiação UVC que se encontra na faixa de 200 a 290 nm não atinge a superfície terrestre, não apresentando, portanto, relevância clínica (DUPONT; GOMEZ; BILODEAU, 2013; NARAYANAN et al., 2010).

Os efeitos fotobiológicos induzidos pelas radiações UVB e UVA estão relacionados com as características específicas de cada radiação. A radiação UVB devido ao seu menor comprimento de onda é altamente energética e capaz de penetrar nas camadas mais superficiais da pele. Já a radiação UVA apresenta maior comprimento de onda, o que a torna capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele, como a derme (NARAYANAN et al., 2010; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Dessa forma, enquanto a radiação UVB, essencialmente, provoca danos diretos na epiderme, como lesões no DNA, eritema, inflamações e queimaduras

solares, a radiação UVA atinge a derme e leva a alterações nos fibroblastos e desorganização da matriz extracelular, resultando em fotoenvelhecimento (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

Dentre as lesões cutâneas induzidas pela radiação UV, o câncer de pele apresenta grande relevância, uma vez que possui alta incidência em todo o mundo. Embora a patogênese do câncer de pele seja multifatorial, a radiação UV tem um papel fundamental, uma vez que é considerado um carcinógeno potente (PRESTON; STERN, 1992; GILCHREST et al., 1999).

O câncer de pele é dividido em dois tipos, dependendo do tipo celular atingido: o câncer tipo não-melanoma e o tipo melanoma.

O desenvolvimento do câncer de pele do tipo não-melanoma, como o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular, ocorre quase que exclusivamente em áreas expostas ao Sol, representando cerca de 30% de todos os cânceres diagnosticados no mundo (NARAYANAN et al., 2010; CHINEM; MIOT, 2011).

Além disso, exposições intermitentes ao Sol e queimaduras solares intensas, com presença de bolhas ou que ocorram nos primeiros anos de vida, predispõem os indivíduos a um maior risco de desenvolvimento do câncer de pele do tipo melanoma, o qual é considerado agressivo e metastático (MARROT, 2004; MARROT; MEUNIER, 2008; SKLAR et al., 2013). Embora este tipo de câncer corresponda a apenas 3% dos cânceres de pele, é o que apresenta maior índice de mortalidade (NARAYANAN et al., 2010).

Os efeitos genotóxicos da radiação UVB se associam com sua capacidade em provocar lesões específicas na molécula de DNA por meio da absorção direta de fótons. Dois tipos de lesões são majoritariamente formados: dímeros de ciclobutano pirimidinas (CPDs) e o fotoproducto (6-4)- pirimidina-pirimidona (6-4 PPs). Uma vez que esses produtos não sejam reparados por enzimas específicas, poderão ameaçar a viabilidade e integridade funcional das células e, por consequência, contribuir com processos mutagênicos e tumorigênicos (MITCHELL et al., 2003).

Além do câncer, a radiação UV pode levar a outros danos na pele. O eritema é a alteração fisiológica mais comum provocada pela exposição ao Sol, sendo resultado da inflamação ocorrida na pele. Ambas as radiações UVB e UVA podem causar este tipo de reação, no entanto, é requerida uma dose mil vezes maior de

radiação UVA em relação à UVB para se conseguir o mesmo efeito (SKLAR et al., 2013; DUPONT; GOMEZ, BILODEAU, 2013).

Por outro lado, a radiação UVA é a principal responsável pela geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), através da excitação de cromóforos celulares, como, riboflavina, porfirina e feomelanina (MARROT; MEUNIER, 2008). As EROs apresentam um papel fundamental no processo de carcinogênese, uma vez que são capazes de provocar alterações nas funções celulares, danos na molécula de DNA além levar ao fotoenvelhecimento (AFAQ, 2011).

O gene supressor de tumor p53 apresenta fundamental importância em proteger a integridade do genoma celular, por meio da regulação do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. No entanto, a irradiação de células de mamíferos pela luz solar resulta em um aumento na expressão do gene p53 no núcleo, o que o torna um marcador relevante para se avaliar a intensidade do estresse genotóxico (MARROT; MEUNIER, 2008; WEBER et al., 2005).

A exposição crônica à radiação UV apresenta um papel crítico no processo de envelhecimento cutâneo, sendo que o principal mecanismo consiste no aumento da expressão de metaloproteinases (MMPs), as quais são responsáveis pela degradação das fibras de colágeno (PINNELL; DURHAM, 2003; JEAN et al., 2011).

As células de Langerhans, também são reduzidas no envelhecimento cutâneo e sofrem alterações morfológicas e funcionais, diminuindo sua capacidade de capturar antígenos. Além disso, a imunossupressão também é um importante evento no processo de carcinogênese (BUSHAN et al., 2002; GREWE et al., 2001).

2.2. Fotoproteção

2.2.1. Filtros solares

Apesar de todos os efeitos deletérios causados pela exposição da pele à radiação UV, diversos estudos demonstram que a aplicação regular de filtros solares constitui uma das estratégias mais eficientes em reduzir as quantidades de radiação UVA e UVB que penetram na pele, prevenindo e/ou amenizando, desta forma, as lesões de efeito imediato e de longo prazo induzidas por essas radiações (GAROLI et al., 2008; GONZALEZ; LORENTE; CALZADA, 2008; VENDITTI et al., 2011).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2012) protetor solar é *“qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato*

com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação UV”.

Sendo assim, os filtros solares podem ser classificados em dois tipos: os filtros solares físicos (ou inorgânicos) e os filtros solares químicos (ou orgânicos). O dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) são os únicos filtros solares físicos disponíveis no mercado, e conferem proteção principalmente por meio da reflexão e dispersão das radiações UVA e UVB. Apesar de proporcionarem proteção efetiva contra a radiação UV e serem estáveis, apresentam o inconveniente de desenvolverem uma coloração opaca esbranquiçada sobre a pele após aplicação (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Diante disso, diversas estratégias foram desenvolvidas a fim de melhorar a aceitabilidade dos consumidores frente a esses filtros, como a encapsulação e a utilização de partículas micronizadas, sem que houvesse redução da eficácia fotoprotetora (SHAATH, 2010).

Já os filtros solares químicos (ou orgânicos) conferem proteção por meio da absorção da radiação UV. Essas moléculas podem ser divididas em diferentes classes, de acordo com suas estruturas químicas, sendo que dentre essas classes estão: aminobenzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, derivados de cânfora, cianoacrilatos, dibenzoilmetanos e DHHB (SHAATH, 2010).

Os **aminobenzoatos**, derivados do ácido para-amino benzoico (PABA), foram as primeiras moléculas a serem utilizadas como filtros solares. São caracterizados por apresentar um anel dissustituído em posição *para*, por um grupo doador de elétrons amino (NR_2) e um grupo aceptor de elétrons ácido carboxílico (COOH), que permite a deslocalização eletrônica. Além disso, apresentam absorção máxima em 290 nm (SHAATH, 2010).

Diversos estudos demonstraram o potencial desta molécula em causar reações fotoalérgicas e induzir a carcinogênese, sendo que estes eventos estão relacionados à fotorreatividade e fotodegradação sofrida por esta molécula. Devido a esses dados seu uso foi interrompido e até hoje se utiliza o *claim* PABA-free, ou seja, livre de PABA (Figura 1) (WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010; NASH, 2006).

Figura 1- Mecanismo da deslocalização eletrônica do PABA.

Fonte: SHAATH, 2010.

Os **salicilatos** apresentam absorção máxima em torno de 300 nm e têm a estrutura química caracterizada pela presença de um anel aromático dissustituído em posição *orto*, um grupo doador de elétrons (OH) e um grupo aceptor de elétrons (COOR), que permite a deslocalização eletrônica (SHAATH, 2010).

Os principais representantes dessa classe são o salicilato de etilexila e homosalato. Apesar de serem considerados fracos absorvedores de radiação UVB são bastante utilizados em formulações fotoprotetoras, uma vez que são fotoestáveis, não apresentam potencial em causar reações fotoalérgicas e por fim, contribuem para o aumento do FPS de formulações (Figura 2) (SAMBANDAN; RATNER, 2011; ROELANDTS et al, 1998).

Figura 2- Mecanismo de deslocalização eletrônica dos salicilatos.

Fonte: SHAATH, 2010.

Os **cinamatos** são moléculas que apresentam um anel aromático dissustituído em posição *para* por um grupo doador de elétrons (OCH₃) e por um grupo aceptor de elétrons (éster conjugado com dupla ligação) o que possibilita a deslocalização eletrônica, tornando-a capaz de absorver na região de 310 nm. O metoxicinamato de etilexila é o principal representante da classe dos cinamatos, sendo o filtro solar mais utilizado no mundo (SHAATH, 2010).

Esse composto está sujeito a sofrer fotoisomerização *cis-trans* (*cis*- isômero Z; *trans*- isômero E). O isômero *E* é predominante e apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ de 310 nm,

com um coeficiente de absorvidade molar elevado, de $19.500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Já o isômero *Z*, formado após exposição à radiação UV, apresenta coeficiente de absorvidade molar bem inferior, de $10.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o que leva à redução da absorção UVB (SHAATH, 2010; PATTANAARGSON et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3- Mecanismo de deslocalização eletrônica dos cinamatos.
Fonte: SHAATH, 2010.

As **benzofenonas** são cetonas aromáticas, as quais podem absorver em dois comprimentos de distintos, com picos máximos de absorção em 286 nm (UVB) e 324 nm (UVA) (Figura 4) (SHAATH, 2010). Apresentam fotoestabilidade, no entanto diversos estudos demonstraram que essa classe está sujeita a sofrer absorção sistêmica, podendo ser detectada em amostras de urina e sangue (JANJUA et al., 2004).

Figura 4- Mecanismo de deslocalização eletrônica da benzofenona.
Fonte: SHAATH, 2010.

O 4-metilbenzilideno cânfora (Figura 5), é um **derivado da cânfora**, que apresenta absorção na região do UVB, amplamente utilizado por apresentar um excelente perfil de fotoestabilidade. Já o ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico é considerado um filtro de amplo espectro, uma vez que apresenta absorção na faixa

entre 290 e 390 nm, com pico máximo de absorção em 345 nm (UVA). Além disso, é fotoestável e não apresenta permeação cutânea (TUCHINDA, 2006).

Figura 5- Estrutura molecular do 4-metilbenzilideno cânfora.
Fonte: KOCKLER et al., 2012.

O octocrileno (Figura 6) é um **cianoacrilato**, capaz de absorver a radiação na faixa de 290 a 360 nm, com pico máximo de absorção em 307 nm (NASH, 2006). Até pouco tempo atrás o octocrileno era considerado um filtro com excelente perfil de segurança, no entanto, estudos demonstraram seu potencial em causar alergias e capacidade de gerar EROs (MANOVÁ; VON GOETZ; HUNGERBUHLER, 2014; HANSON et al., 2006).

Figura 6- Estrutura molecular do octocrileno.
Fonte: KOCKLER et al., 2012.

Em relação aos **dibenzoilmetanos** o butil metoxidibenzoilmetano, conhecido popularmente como avobenzona é o seu principal representante. Essa molécula está entre os filtros solares UVA mais utilizados mundialmente, entretanto, apresenta fotoinstabilidade (SHAATH, 2010).

O mecanismo de fotodegradação da avobenzona é proposto por meio do tautomerismo ceto-enólico (**AVO^E** - **AVO^K**) sofrido por essa molécula após exposição à radiação UV (Figura 7).

Figura 7- Tautomerismo ceto-enólico sofrido pela avobenzona.
 Fonte: SHAATH, 2010.

Em solução existe um equilíbrio entre as formas cetona e enol, o qual é deslocado no sentido de formação do tautômero enol (**AVO^E**), que apresenta alta absorção na região do UVA, com pico máximo de absorção em 360 nm. No entanto, após irradiação, esse equilíbrio é deslocado no sentido de formação da forma cetona (**AVO^K**), que por sua vez, apresenta absorção na região do UVC, entre 260 e 280 nm, resultando na perda de sua eficácia fotoprotetora. A forma cetona pode absorver fótons e atingir o estado excitado tripleto (**³AVO^K**), o qual é o principal responsável pelos efeitos prejudiciais da avobenzona. Nesse estado excitado pode haver formação de fotoprodutos. Além disso, pode ocorrer transferência de energia para o oxigênio molecular (**O₂**), o que acarreta na formação do oxigênio singleto (**¹O₂**), que por sua vez pode reagir com a forma enol (**AVO^E**) e levar a formação de produtos de oxidação (Figura 8) (LHIAUBEUT-VALLET, 2010; KOCKLER et al., 2012; SHAATH, 2010).

Figura 8- Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona

2.2.2. Antioxidantes

Os átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, são denominados de radicais livres, que são altamente reativos e instáveis (BARREIROS et al., 2006). Quando o elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio, os radicais livres são denominados espécies reativas do oxigênio (EROs), os quais incluem os radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peroxil ($ROO^{\bullet}$), alcoxil ($RO^{\bullet}$), hidroxil ($^{\bullet}OH$), além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2) (LOBO et al., 2010).

Os radicais livres são produzidos continuamente no organismo durante os processos metabólicos, cumprindo funções biológicas relevantes. Podem também ser produzidos em decorrência de processos inflamatórios, disfunções biológicas e exposição a agressões ambientais, como a radiação UV (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

Para controlar o excesso de radicais livres, nosso organismo dispõe de um sistema eficiente de defesa antioxidante, capaz de estabelecer um equilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies reativas (VASCONCELOS et al., 2007).

No entanto, a capacidade do sistema antioxidante endógeno é limitada e sua depleção resulta no estresse oxidativo, que se caracteriza pela oxidação das biomoléculas, como proteínas, lipídios, DNA, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al., 2010). Diversos estudos demonstram que essas lesões oxidativas estão associadas com a causa de diversas alterações na pele, como eritema, inflamação e eventos genotóxicos, os quais podem favorecer o desenvolvimento do câncer de pele. (VERSCHOOTEN et al., 2006).

Considerando que a exposição à radiação UV pode aumentar a produção de EROs e inativar os componentes do sistema antioxidante, e que os filtros solares não proporcionam uma proteção completamente eficaz, o uso de substâncias naturais com potencial antioxidante pode fornecer novas perspectivas para a prevenção de danos oxidativos mediados pelos radicais livres (AFAQ, 2011).

Nesse sentido, estudos demonstram que os polifenóis estão entre os agentes preventivos mais promissores para serem utilizados contra desordens da pele (AFAQ, 2011). A maioria dos polifenóis apresenta semelhanças estruturais com os filtros orgânicos convencionais podendo, portanto, absorver a radiação UV em todo

espectro UVB e em parte do espectro UVA. Dessa forma, a aplicação tópica desses antioxidantes pode complementar a proteção oferecida pelos filtros solares convencionais (NICHOLS; KATIIYAR, 2010; AFAQ, 2011).

2.2.2.1. Mangiferina

A mangiferina é uma xantona C-glicosilada da classe dos polifenóis (Figura 11), que apresenta alta absorção na região do UV, com picos de absorção em 319 e 368 nm (CANUTO et al., 2009; KAWAKAMI et al., 2013). É o principal componente ativo presente no Vimang[®], um extrato aquoso de *Mangifera indica* (mangueira), tradicionalmente utilizado em Cuba (ZHANG; FANG; CHEN, 2013). Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas a essa molécula, tais como: atividade antioxidante, antiinflamatória, analgésica, antiviral, radioprotetora (ESPARZA et al., 2009; DAS et al., 2012; RODEIRO et al., 2012).

De acordo com alguns estudos a mangiferina foi capaz de sequestrar as EROs, como íons superóxido e hidroxil e recuperar as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, antioxidantes endógenos (ESPARZA et al., 2009; PAL; SINHA; SIL, 2013).

Figura 11- Estrutura molecular da mangiferina.

Fonte: Adaptado de KIM et al., 2012.

Outros estudos mostraram que a administração oral da mangiferina, em camundongos, foi capaz de prevenir significativamente a formação de rugas, o espessamento da pele e a perda das fibras de colágeno, induzidas pela radiação UVB. Além disso, a administração dessa substância provocou uma redução significativa na expressão de metaloproteinasas (MMPs), as quais são capazes de degradar o colágeno e as principais proteínas estruturais da pele, levando, desta forma, ao envelhecimento cutâneo (KIM et al., 2012; SONG et al., 2013).

Segundo Rodeiro e colaboradores (2012) a mangiferina não apresentou citotoxicidade, mutagenicidade ou potencial genotóxico quando avaliada por diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo*, ao invés disso, foi observada uma elevada proteção contra danos no DNA, quando essa substância estava presente. Foi também observado que a mangiferina apresentou um elevado efeito radioprotetor, pois foi capaz de reduzir a ação citotóxica da radiação ionizante, a qual é muito utilizada com finalidade terapêutica em pacientes com câncer, no entanto, pode causar injúrias nas células normais adjacentes à massa tumoral. Essa capacidade foi atribuída à sua elevada atividade antioxidante (JAGETIA; VENKATESHA, 2005).

2.2.2.2. Naringenina

A naringenina é uma flavonona pertencente à classe dos polifenóis que apresenta absorção na região do UVB, com pico máximo de absorção em 292 nm (STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014). Essa substância demonstrou apresentar atividade antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória e também anticancerígena, sendo que alguns autores atribuem essas propriedades biológicas devido à presença de grupamentos hidroxilas na sua estrutura molecular (Figura 12) (CHTOUROU et al., 2015; COLLINS et al., 2011; MIR; TIKU, 2015).

Figura 12- Estrutura molecular da naringenina.

Fonte: MIR; TIKU, 2015.

Um estudo realizado por Raza e colaboradores (2013) demonstrou que o tratamento profilático da naringenina em ratos, quando administrados por via oral, é capaz de prevenir a isquemia cerebral. A neuroproteção conferida por essa substância é atribuída às suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, uma vez que exerce atividade inibitória na ativação do fator de transcrição NF- κ B, além de aumentar a atividade dos antioxidantes endógenos e impedir a lipoperoxidação.

Além disso, foi demonstrado que essa molécula foi capaz de reduzir a oxidação de proteínas e danos na molécula de DNA, modulou o processo inflamatório por meio da diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e preveniu a hiperlipidemia (CHTOUROU, et al., 2015).

Embora vários estudos tenham demonstrado os feitos benéficos da naringenina, outros observaram baixa atividade antioxidante, capacidade de reduzir a atividade de antioxidantes endógenos, provocar danos na molécula de DNA, induzir a formação do ânion superóxido e também estimular o processo de peroxidação lipídica, induzida por ferro (YEN, et al., 2003; GALATI et al., 2002; SAHU; GRAY, 1997; PROCHAZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Além disso, pesquisadores observaram que a naringenina pode apresentar diferentes efeitos biológicos dependendo do solvente utilizado e da combinação com o substrato (OHKATSU; SAKURAI; SATO, 2010).

2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores

2.3.1. Eficácia

Os órgãos regulatórios preconizam a realização de alguns testes no processo de desenvolvimento de fotoprotetores, sendo que o FPS *in vivo* constitui o dado mais conhecido para quantificação da eficácia fotoprotetora, uma vez que é aceito universalmente. O FPS é definido como o valor obtido pela razão entre a dose mínima de radiação UV necessária para produzir eritema em uma pele protegida por um protetor solar e a dose mínima requerida para produzir a mesma reação na pele desprotegida. A dose eritematosa mínima corresponde à quantidade de energia necessária para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 a 24 horas após a exposição à radiação (VELASCO et al., 2011; FOURTANIER et al., 2006; BRASIL, 2012).

No entanto, considerando o importante papel biológico da radiação UVA, já descrito anteriormente, o valor do FPS é limitado e insuficiente para avaliar o nível de proteção contra o câncer de pele e o fotoenvelhecimento cutâneo, já que este método não é capaz de prever o nível de proteção UVA. Diante disso, o FDA propôs, nos últimos anos, a inclusão de um método *in vivo* que avalia a resposta da pigmentação da pele após a exposição à radiação UVA de 2 a 4 horas, denominado de Pigmentação Persistente (PPD- *Persistent Pigment Darkening*) (LIM; DRAELOS, 2009; VELASCO et al., 2011).

Dentre os métodos *in vitro* destaca-se o comprimento de onda crítico, que corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área integrada entre 290-400 nm. Um fotoprotetor para ser considerado como adequado na proteção contra a radiação UVA deve apresentar valor de comprimento de onda crítico superior a 370 nm, sendo que quanto maior esse valor, maior será a proteção com relação à radiação UVA. Já a razão UVA/UVB, ou *Boot's Star Rating*, envolve a medida da absorbância no intervalo de 290 e 400 nm e está associada com a proteção frente à radiação UVA. Os resultados podem ser expostos com estrelas, sendo que o maior número de estrelas corresponde a uma maior proteção UVA estimada (Tabela 1) (BRASIL, 2012; VELASCO et al., 2011).

Tabela 1- Sistema *Boot's Star Rating* relacionado com a razão UVA/UVB. Adaptado de VELASCO et al., 2011.

Razão UVA/UVB	Estrelas	Descrição da proteção UVA
0,0 até < 0,2	-	Muito baixa
0,2 até < 0,4	*	Moderada
0,4 até < 0,6	**	Boa
0,6 até < 0,8	***	Superior
0,8 até < 0,9	****	Máxima
≥ 0,9	*****	Ultra

Em junho de 2012, a ANVISA aprovou o Regulamento Técnico Mercosul sobre protetores solares e cosméticos (BRASIL, 2012), que definiu alguns parâmetros a serem adotados para novos protetores solares, entre eles: apresentar FPS de no mínimo 6, apresentar Fator de Proteção UVA cujo valor corresponda a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem.

2.3.2. Fotoestabilidade

Embora os parâmetros de avaliação de eficácia dos fotoprotetores, propostos pelas agências nacionais e internacionais, avaliem o grau de proteção dos indivíduos frente às radiações UVA e UVB os mesmos não levam em consideração a fotoestabilidade do produto, portanto, não predizem adequadamente o nível de proteção contra os danos biológicos. A fotoestabilidade dos filtros solares está relacionada à capacidade intrínseca dessas moléculas de não sofrerem alterações estruturais durante o período de exposição ao UV, garantindo desta forma, a eficácia

fotoprotetora (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006; KOCKLER et al., 2012). No entanto, grande parte das moléculas utilizadas como filtros solares apresenta fotorreatividade e estão sujeitas a reações de fotodegradação.

A diminuição da capacidade absorptiva em decorrência da fotoinstabilidade dos filtros solares resulta no aumento da quantidade de radiação que incide direto sobre a pele e, conseqüentemente, expõe o indivíduo aos efeitos deletérios da radiação UV (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). Além disso, esse processo pode também levar à formação de intermediários reativos, os quais podem provocar dermatites de contato e reações fototóxicas, além de resultar na formação do oxigênio singlete (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; CHATELAIN; GABARD, 2001; DAMIANI et al., 2000; CHAUDHURI et al., 2006).

A fim de compreender os mecanismos que levam à fotodegradação dos filtros solares, é necessário fazer uma breve elucidação da fotoquímica dos mesmos. Após absorção de um fóton, a molécula do filtro solar orgânico que estava no estado fundamental eletrônico (S_0) vai para um estado excitado de maior energia, denominado estado excitado singlete (S_1) (Figura 13). A partir desse estado a molécula poderá retornar ao seu estado fundamental por um processo de relaxação física conhecida como conversão interna, através da emissão de fluorescência (FL), ou sofrendo fotorreações (SHAATH, 2010; BONDA, 2010).

A molécula excitada pode sofrer a conversão intersistemas (ICS) e atingir um estado de menor energia, conhecido como estado excitado tripleto (T_1). A partir desse estado excitado a molécula pode retornar diretamente ao estado fundamental pelo processo de conversão interna, por meio da emissão de fosforescência (FO) ou ainda, desencadear reações fotoquímicas. Essas reações podem provocar mudanças estruturais nos filtros solares, o que pode comprometer sua capacidade absorptiva (fotodegradação) e levar à formação de EROs e 1O_2 (NASH; TANNER, 2014; WONDRAK et al., 2005; SHAATH, 2010).

O 1O_2 é considerado o principal mediador dos danos em sistemas biológicos e está envolvido no processo de mutagênese, apoptose, fotoenvelhecimento e carcinogênese (WONDRAK et al., 2005; SHAATH, 2010; BONDA, 2010). Assim, um filtro solar ideal deveria retornar ao estado fundamental, dissipando a energia absorvida, sem sofrer reações fotoquímicas.

Figura 13- Diagrama de Jablonski. S0: estado fundamental, S1: estado excitado singleto, T1: estado excitado tripleto, ICS: conversão intersistemas, FL: fluorescência, FO: fosforescência.

Fonte: Adaptado de BONDA et al., 2010.

Estudos demonstraram que a fotoinstabilidade da avobenzona leva à geração de vários produtos de fotodegradação, como arilglioxais e benzílicos, os quais estão relacionados com seu potencial fotoalérgico, fototóxico e capacidade de promover a sensibilização cutânea (GASPAR et al., 2013; NASH; TANNER, 2014; KARLSSON et al., 2009). Além disso, um estudo demonstrou que a avobenzona, aumentou em três vezes a produção de EROs, após ser submetida à radiação UVA (DAMIANI, et al., 2007).

Nesse contexto, o uso de moléculas capazes de reduzir a fotodegradação dos filtros solares é uma alternativa interessante e vem fornecendo novas perspectivas para a fotoestabilização da avobenzona. Essas moléculas, conhecidas como fotoestabilizadores, apresentam dois mecanismos distintos de ação: o primeiro baseado na competição pela absorção de fótons e o segundo, baseado na transferência de energia dos estados excitados. No último caso, os fotoestabilizadores podem atuar por diferentes formas: neutralizando os estados excitados dos filtros solares ou neutralizando as EROs, através de sua atividade antioxidante (SHAATH, 2010; BONDA, 2010; SHAATH, 2007).

O octocrileno, o bemotrizinol e o etilexil metoxicrileno são exemplos de fotoestabilizadores, os quais são capazes de melhorar a fotoestabilidade da avobenzona (BONDA et al., 2010).

Considerando que os parâmetros atualmente disponíveis para a avaliação da eficácia fotoprotetora não consideram alguns aspectos importantes da proteção UV, estudos que comprovem a fotoestabilidade dos fotoprotetores devem ser realizados, uma vez que os produtos resultantes da fotodegradação dos filtros solares podem comprometer a segurança do produto.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem apresentado algumas contribuições nessa área, uma vez que avaliamos a fotoestabilidade de algumas associações de filtros solares, bem como a influência da fotoestabilidade na eficácia de fotoprotetores e obtivemos associações fotoestáveis contendo diferentes filtros solares (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015).

2.3.3. Segurança

Na Europa, a partir de março de 2013, os ensaios para avaliação da segurança de ingredientes e produtos cosméticos, *in vivo*, foram proibidos (VINARDELL, 2015). O princípio em substituir o uso de animais em experimentação está baseado na política dos 3R's, cujo conceito foi introduzido por William Russel e Rex Burch, em 1957, no livro *Principles of Human Experimental Technique*. Os 3R's representam o refinamento, redução e substituição (*Refine, Reduction and Replacement*) e têm como estratégia uma pesquisa racional minimizando o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico e almejando, futuramente, a total substituição de animais por modelos experimentais alternativos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

Dentre os métodos alternativos que já se encontram validados e estão descritos pelos órgãos regulatórios está o teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3 (3T3 NRU PT: 3T3- *Neutral Red Uptake- Phototoxicity Test*) (LIEBSCH et al., 2005). Este teste foi validado com sucesso entre os anos de 1992 e 1998 pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) e o primeiro teste aceito para fins regulatórios pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), no ano de 2002 (OECD, 2004).

O ensaio de fototoxicidade consiste na avaliação da viabilidade das células tratadas com determinada substância ativa, em oito concentrações diferentes,

quando submetidas ou não à irradiação UVA, para posterior determinação da fototoxicidade e citotoxicidade, respectivamente (LIEBSCH et al., 2005).

A OECD preconiza o estabelecimento de algumas estratégias para a determinação do potencial fototóxico de substâncias, sendo que o passo inicial consiste na determinação do espectro de absorção no UV. Se as substâncias apresentarem boa absorção na região do UVA ou UVB, o teste de fototoxicidade 3T3 NRU PT poderá ser realizado. Caso contrário, se as mesmas apresentarem absorção insignificante nessa região, as fotorreações são improváveis de acontecer, e, portanto, não há necessidade de submetê-las a esse estudo (JONES et al., 2003; LIEBSCH et al., 2005).

Devido a sua alta especificidade e sensibilidade, esse teste é considerado o padrão ouro e, geralmente, o único teste necessário para avaliação da fototoxicidade aguda, quando a substância não apresenta potencial fototóxico. No caso das substâncias apresentarem potencial fototóxico é recomendado que, outras ferramentas adicionais sejam utilizadas a fim de elucidar a biodisponibilidade das substâncias testadas, sendo que o modelo pele humana reconstituída tem sido utilizado para este propósito (LIEBSCH et al., 2005; CERIDONO et al., 2012).

Por fim, se as substâncias em estudo não apresentarem potencial fototóxico no modelo de pele humana reconstituída, a última etapa do estudo poderá ser, então, conduzida, sendo que a mesma consiste na realização de testes clínicos para avaliar o potencial fototóxico e fotoalergênico (*photopatch*). Os resultados negativos para esse testes em humanos indicam que as substâncias podem ser consideradas seguras para uso tópico (GASPAR et al., 2013; LIEBSCH et al., 2005; KEJLOVÁ et al., 2007).

Atualmente, a OECD está avaliando a inclusão de outro teste para auxiliar na determinação do potencial fototóxico de uma substância, o qual é denominado teste de fotorreatividade. Esse teste, já reconhecido pelo ICH (*International Conference on Harmonization*) consiste em um teste *in chemico* (que não envolve metabolismo celular) baseado na identificação de EROs (especificamente ânion superóxido e oxigênio singlete) formadas após a exposição de substâncias fotorreativas à irradiação. Embora o mesmo não seja preconizado para determinação do potencial fototóxico, é utilizado como uma ferramenta de triagem, anterior ao estudo de fototoxicidade pelo 3T3 NRU PT. Desta forma, se uma substância não apresentar fotorreatividade, provavelmente não apresentará potencial fototóxico, e, portanto, o

estudo de fototoxicidade não precisará ser realizado (JACVAM, 2013; ONOUE et al., 2008).

3.Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a fotoestabilidade e a fototoxicidade de formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares acrescidas de mangiferina e naringenina.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver formulações fotoprotetoras com FPS estimado de 30 contendo diferentes associações dos filtros solares avobenzona, metoxicinamato de etilexila, octocrileno e DHHB e dos polifenóis mangiferina e naringenina;
- Desenvolver e padronizar o método de CLAE para identificação simultânea dos filtros solares e polifenóis em estudo;
- Avaliar a fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras por meio de CLAE;
- Avaliar a fotoestabilidade das formulações fotoprotetoras por meio de espectrofotometria no UV;
- Avaliação da fototoxicidade das substâncias e associações em estudo em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT).

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias-primas e reagentes

As matérias-primas utilizadas estão descritas de acordo com a nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) e com a denominação comum internacional ou INN (*International Non-proprietary Name*) disponibilizada pela Comissão das Comunidades Europeias (2006) e, quando necessário, também estão descritos o nome comercial e fornecedor.

- Ácido acético glacial, PA, Synth;
- Água destilada e deionizada;
- Álcool etílico, PA, Synth;
- Álcool metílico, grau HPLC, JT Baker;
- Álcool metílico, PA, Synth;
- Alquil benzoato C12-15 (nomenclatura INCI: C12-15 ALKYL BENZOATE)- Crodamol™ AB, Croda;
- Avobenzona (nomenclatura INCI: BUTYLMETHOXYDIBENZOYLMETHANE; denominação INN: avobenzona)- Parsol® 1789, DSM;
- Base autoemulsificante A: álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato cetet-10 (nomenclatura INCI: CETEARYL ALCOHOL, DICETYL PHOSPHATE AND CETETH-10 PHOSPHATE)- Crodafos CES®, Croda;
- Base autoemulsificante B: álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico (nomenclatura INCI: CETEARYL ALCOHOL AND CETEARYL GLUCOSIDE)- Montanov 68®, Chemyunion;
- BHT (denominação INN: Butil-hidroxitolueno);
- *Blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e emulsificantes contendo hidroxietil acrilato e copolímero de acriloldimetiltaurato de sódio, esqualano, polissorbato 60- Simulgel NS®, Chemyunion;
- Ciclometicone volátil (INCI: CYCLOMETHICONE)- SF1204, GE Silicones;
- Cloreto de cálcio, PA, Synth;
- Cloreto de magnésio, PA, Synth;
- Cloreto de potássio, PA, Synth;
- Cloreto de sódio, PA, Synth;
- Corante vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) código 1.01369.0025, Merck;

- Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato (nomenclatura INCI: DIETYLAMINO HYDROXYBENZOYL HEXYL BENZOATE) (DHHB) - Uvinul® A Plus Granular, Basf;
- Dimetilsulfóxido, PA, (DMSO)- Synth;
- Fenoxietanol e parabenos (nomenclatura INCI: PHENOXYETHANOL (AND) METHYLPARABEN (AND) ETHYLPARABEN (AND) PROPYLPARABEN (AND) BUTYLPARABEN)- Phenova, Mapric;
- Fosfato de potássio monobásico anidro, PA, Synth;
- Fosfato de sódio dibásico heptaidratado, PA, Synth;
- Glicerina, PA, Synth;
- L-Glutamina, código G7513, Sigma Aldrich;
- L-Histidina, código H8000, Sigma Aldrich;
- Mangiferina - código M3547, Sigma Aldrich;
- Meio DMEM (Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium), código BR 30003-05, LGC Biotecnologia;
- Metoxicinamato de etilexila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE)- Uvinul® MC 80, Basf;
- Miristato de isopropila, Crodamol™ IPM, Croda;
- Naringenina, código N5893, Sigma Aldrich;
- Norfloxacin, código N9890, Sigma Aldrich;
- Octocrileno (nomenclatura INCI: OCTOCRYLENE, denominação INN: octocrileno) - Neo Heliopan® 303, Symrise;
- Penicilina - Streptomycin, código A5955, Sigma Aldrich;
- Propilenoglicol, PA, Synth;
- Soro bovino fetal, código 12657029, Invitrogen;
- Tripsina, código T4174, Sigma Aldrich;

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador de microplacas, MTS 4 IKA, Schuttler;
- Agitador mecânico, modelo 713D, Fisatom;
- Balança analítica Shimadzu AUW220D;
- Balança semi-analítica, modelo BL-3200H, Marte;

- Cabine de segurança biológica, Classe II, PA 410 ECO, Pachane;
- Centrífuga, modelo EEQ-9004/A, Edutec;
- Centrífuga, modelo Sorvall Legend Mach 1.6 R, Thermo Scientific;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250 mm, 5 μ m);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, Shimadzu;
- Espectrofotômetro Agilent 8453;
- Estufa com termostato e controle de umidade Olidef CZ;
- Filtros com membrana em politetrafluoretileno (PTFE), com 0,45 μ m de porosidade e 13 mm de diâmetro, Millipore;
- Frascos de cultura celular de 75 cm³;
- Incubadora de CO₂, Forma Series II Water-Jacket, Thermo Scientific;
- Lâmpadas Phillips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven, Netherlands);
- Leitor de microplacas, μ Quant, Bio-Tec Instruments;
- Microplacas de poliestireno com fundo chato com tampa de 96 poços;
- Microscópio invertido, modelo Primo Vert, Zeiss;
- Papel de filtro 15 cm de diâmetro e 25 μ m de porosidade, Quanty;
- Peagômetro, mPA-210 MS Tecnopon;
- Pipetador automático;
- Pipetas automáticas;
- Placa aquecedora, modelo 503, Fisatom;
- Radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Valle, França) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA;
- Sonicador Ultrasonic Clean Ultra Cleaner 750;
- Tubos de 2 mL, Eppendorf;
- Tubos falcons de 15 e 50 mL;
- Vidrarias em geral;
- Vórtex IKA MS2, Minishaker.

4.2. Métodos

4.2.1. Elaboração das formulações

Foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras com FPS estimado de 30 a base dos filtros solares: avobenzona, metoxicinamato de etilexila, octocrileno e DHHB. Para a determinação das concentrações dos filtros solares empregadas nas formulações fotoprotetoras, foi utilizado o programa *BASF Sunscreen Simulator* (2013), por meio do qual foram determinadas três diferentes associações de filtros solares: associação 1 (avobenzona, metoxicinamato de etilexila e octocrileno), associação 2 (DHHB, metoxicinamato de etilexila e octocrileno), associação 3 (avobenzona, DHHB, metoxicinamato de etilexila e octocrileno).

Essas formulações foram elaboradas com duas diferentes bases autoemulsificantes: formulação A (FA), contendo base autoemulsificante A (álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato cetet-10, Crodafos CES[®], Croda) e formulação B (FB), contendo base autoemulsificante B (álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico, Montanov 68[®], Chemyunion), resultando no total de seis formulações diferentes. Foram ainda utilizados os emolientes miristato de isopropila e alquilbenzoato C12-15, bem como as matérias-primas propilenoglicol, glicerina, água, fenoxietanol e parabenos, BHT, ciclometicone, um *blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e tensoativos (hidroxietil acrilato e copolímero de acriloldimetiltaurato de sódio, esqualano, polissorbato 60, Simulgel NS[®], Chemyunion).

As seis diferentes formulações (FA1, FA2, FA3, FB1, FB2, FB3) foram, ainda, acrescidas ou não da associação de 0,4% de mangiferina (Sigma Aldrich[®]) e de 0,4% de naringenina (Sigma Aldrich[®]) (FA1MN, FA2MN, FA3MN, FB1MN, FB2MN e FB3MN), resultando em um total de 12 formulações e, a seguir, foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade, descritos no item 4.2.2., com o intuito de definir qual a formulação mais estável para os testes subsequentes. O pH das formulações foi, ainda, ajustado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a fim de obter valores de pH na faixa entre 5,6 e 6,3.

As formulações contendo as duas diferentes bases autoemulsificantes e as três associações de filtros solares estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Composição das formulações submetidas aos testes preliminares de estabilidade (% p/p).

Substância	Base autoemulsificante A			Base autoemulsificante B		
	FA1	FA2	FA3	FB1	FB2	FB3
Hidroxietyl acrilato e copolímero de acriloldimetiltaurato de sódio, esqualano e polissorbato 60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Miristato de isopropila	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Propilenoglicol	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Glicerina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Base autoemulsificante A	3,00	3,00	3,00	-	-	-
Base autoemulsificante B	-	-	-	3,00	3,00	3,00
Alquilbenzoato C12-15	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Avobenzona	4,00	-	4,00	4,00	-	4,00
Metoxicinamato de etilexila	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Octocrileno	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
DHHB	-	5,00	5,00	-	5,00	5,00
Água q.s.p	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

As formulações contendo a base autoemulsificante B foram consideradas as mais estáveis nos testes preliminares de estabilidade, sendo esta base, portanto, selecionada para o teste de fotoestabilidade, descrito no item 4.2.3. Desta forma, foram elaboradas formulações fotoprotetoras preparadas com a base autoemulsificante B, contendo as três associações de filtros solares em estudo (FB1, FB2 e FB3), acrescidas de mangiferina (FB1M, FB2M e FB3M), de naringenina (FB1N, FB2N e FB3N) e da associação desses polifenóis (FB1MN, FB2MN e

4.2.2. Testes preliminares de estabilidade

As formulações apresentadas na Tabela 2 foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual diária durante 15 dias quando mantidas no ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 45°C. No teste de centrifugação, cinco gramas de cada amostra objeto de estudo foram centrifugados a 3000 rpm, por 30 minutos, em centrífuga Edutec, modelo EEQ-9004/A. Esse estudo foi repetido após 15 dias de armazenagem, tanto para as formulações mantidas no ambiente quanto para as formulações submetidas ao estresse térmico de 45°C. A medida de pH das formulações em estudo foi realizada utilizando peagômetro Tecnopon, modelo MS mPA-210 por meio de amostras diluídas em água destilada (10%), no tempo zero e após 15 dias de armazenagem, em temperatura ambiente e a 45°C. Na avaliação visual, foram consideradas, após prévio estoque em temperatura ambiente e a 45°C, as seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade (BRASIL, 2004).

4.2.3. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para as 12 formulações apresentadas na Tabela 3. As formulações, contendo as diferentes associações de filtros solares, e acrescidas ou não de mangiferina e naringenina, isoladamente ou em associação, foram submetidas ao estudo de fotoestabilidade por meio da determinação da concentração remanescente dos filtros solares e antioxidantes presentes nas formulações irradiadas e não irradiadas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e por meio da determinação da razão UVA/UVB das formulações irradiadas e não irradiadas, utilizando espectrofotometria no UV.

4.2.3.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo

Foram aplicadas, em lâminas de vidro, 40 mg das formulações e, após 15 minutos, estas foram expostas a uma dose de 275 KJ/m² de radiação UVA (KOCKLER et al., 2012; DAMIANI et al., 2007), na faixa de 320 a 400 nm, durante 115 minutos, emitida por quatro lâmpadas Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven, Netherlands). A dose da radiação UVA emitida foi calculada pelo radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Valle, França) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA. Para cada lâmina submetida à irradiação houve um controle negativo, ou seja, uma lâmina deixada ao abrigo da luz (GASPAR; MAIA

CAMPOS, 2006). As lâminas (controle e expostas à radiação UVA) foram imersas em aproximadamente 20 mL de metanol para dissolução do filme seco em ultrassom, sendo as soluções resultantes filtradas em papel filtro (com porosidade de 25µm), transferidas para balões volumétricos de 25 mL (BESERT et al., 1996, GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007) e o volume completado.

4.2.3.2. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As soluções resultantes após o procedimento de extração descrito no item 4.2.3.1. foram concentradas duas vezes. As soluções concentradas foram submetidas à análise por CLAE em cromatógrafo da marca Shimadzu acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, em coluna de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250 mm, 5 µm) com modo de eluição gradiente.

As condições cromatográficas foram padronizadas e estão descritas a seguir:

- Fase móvel (eluição por gradiente): eluição inicial constante de metanol: água com 2% de ácido acético (5:95) por 2 minutos, seguido por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol: água com 2% de ácido acético (40:60) por 10 minutos, seguido por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol: água com 2% de ácido acético (85:15) por 25 minutos.
- Fluxo da fase móvel: 0,8 mL.min⁻¹.
- Comprimento de onda da análise: 325 nm.
- Volume de amostra injetado: 20 µL.
- Tempo de corrida: 50 minutos.
- Temperatura: ambiente.

A fotoestabilidade das substâncias em estudo foi avaliada por meio da porcentagem remanescente de cada substância após irradiação por UVA. A porcentagem remanescente foi calculada por meio da razão entre a concentração na formulação irradiada e concentração na formulação não irradiada, multiplicada por 100.

4.2.3.2.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003).

Para a determinação da linearidade do método foram elaboradas curvas analíticas em triplicata, a partir de diluições da solução estoque contendo todas as substâncias em estudo, a 2000 µg/mL. As curvas foram preparadas com base em cinco valores de concentração, que variaram de 3,25 a 300 µg/mL dependendo da substância analisada. A linearidade foi avaliada com base nos valores do coeficiente de correlação (r) obtidos a partir das curvas analíticas de cada substância (BRASIL, 2003).

4.2.3.2.2. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método em identificar especificamente as substâncias em estudo, na presença de outros componentes (BRASIL, 2003).

A seletividade foi avaliada por meio da análise dos cromatogramas obtidos após injeção de soluções de metanol contendo as substâncias em estudo, separadamente e em associação, nas concentrações de 100 µg/mL. Para a pesquisa de picos interferentes, foram analisados o solvente utilizado no estudo de fotoestabilidade e o veículo das formulações.

4.2.3.2.3. Precisão e exatidão

A precisão corresponde à capacidade do método analítico em reproduzir o mesmo resultado em várias medidas de uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

Este parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação), por meio da determinação das concentrações dos filtros solares e antioxidantes, obtidas a partir das curvas analíticas (BRASIL, 2003).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A exatidão é a capacidade do método em obter resultados próximos ao valor verdadeiro. Esse parâmetro foi expresso pela relação da concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (BRASIL, 2003):

$$E = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100 \text{ (Equação 2)}$$

Para avaliar a precisão e exatidão/recuperação do método 40 mg da formulação FB3MN, que continha todas as substâncias em estudo, foram aplicadas em lâminas de vidro, mantidas ao abrigo de luz por 15 minutos e posteriormente submetidas ao procedimento de extração descrita no item 4.2.3.1.

Para a determinação da precisão e exatidão/recuperação intra-ensaio, foram avaliadas em sextuplicata, em um mesmo dia, amostras da formulação FB3MN e para a determinação da precisão e exatidão/recuperação inter-ensaio, foram avaliadas em triplicatas, durante três dias consecutivos, as amostras das mesmas formulações.

4.2.3.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

Após realização do procedimento de extração descrito no item 4.2.3.1., as soluções resultantes foram diluídas na proporção de 1:10 e analisadas em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400 nm. O espectro de absorção e a área sob a curva (integral do espectro de absorção) das amostras na faixa do UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) foram determinados, e a razão entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA/UVB foi então obtida (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007).

$$\frac{\int_{320}^{400} A(\lambda) d\lambda / \int_{320}^{400} d\lambda}{\int_{280}^{320} A(\lambda) d\lambda / \int_{280}^{320} d\lambda} \quad \text{(Equação 3)}$$

4.2.3.4. Análise estatística

Os dados experimentais obtidos nos estudos de fotoestabilidade foram submetidos à análise estatística pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), uma

vez que os dados experimentais de todas as amostras apresentaram distribuição normal.

4.2.4. Avaliação da fototoxicidade

O potencial fototóxico dos filtros solares e antioxidantes em estudo foi determinado isoladamente e em associação por meio do teste em cultura de fibroblastos 3T3 NRU PT. Para tal, inicialmente as substâncias foram diluídas em DMSO e submetidas a oito diluições geométricas sucessivas em DPBS, com um fator de diluição constante de 1,47, de forma que a concentração final de DMSO não excedeu 1%. Assim, as oito concentrações estudadas para as substâncias isoladas foram de 6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 µg/mL.

Foram também analisadas as 12 diferentes associações em estudo, contendo a mesma proporção de filtros solares e antioxidantes utilizados nas formulações em estudo, (A1, A1M, A1N, A1MN, A2, A2M, A2N, A2MN, A3, A3M, A3N, A3MN) Para as associações também foi utilizado um fator de diluição de 1,47. Assim, as 8 concentrações estudadas para as associações em estudo foram de 6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 µg/mL (valores referentes ao filtro solar metoxicinamato de etilexila que estava presente em maior concentração nas formulações). Os estudos foram realizados em duplicata.

4.2.4.1. Linhagem celular de fibroblastos 3T3

Foi utilizada uma cultura de fibroblastos linhagem Balb 3T3, clone 31, ATCC (*American Type Culture Collection*), a qual foi utilizada no estudo de validação do método realizado pela Comunidade Européia (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998).

As culturas celulares foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dubbelco) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 4 mM de glutamina, 100 UI de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C, em incubadora de 5% de CO₂, com controle de umidade (Thermo Scientific).

4.2.4.2. Fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme

protocolo INVITTOX nº 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998). Para tal, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo Balb/C 3T3 clone 31, ATCC, conforme apresentado no item 4.2.4.1. As características dos fibroblastos nas diversas etapas do estudo, a sua viabilidade frente à radiação UV e a captação do corante vermelho neutro foram monitorados por microscópio biológico binocular invertido.

Previamente ao início dos estudos, foi avaliada a sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA. Para tal, foram avaliadas três diferentes doses de radiação UVA: 3, 5 e 9 J/cm², o que equivale a 8, 13 e 24 minutos de exposição à radiação UVA de 6,3 mW/cm², emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) e detectada por um radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetector para a medida da radiação UVA (365 nm).

Após a avaliação da sensibilidade das células à irradiação, foram utilizadas duas microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Para tal, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura (1×10^5 células/mL) e, a seguir, foram inoculados 100 µL dessa suspensão (1×10^4 células) em 60 poços centrais de cada microplaca. Os 36 poços laterais das microplacas foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para determinação da citotoxicidade (ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C em incubadora de CO₂, para a formação de uma camada semiconfluente. A seguir as células foram decantadas, separadas do meio de cultura e cada poço foi lavado com DPBS (tampão fosfato modificado por Dubelcco contendo cálcio).

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100 µL de oito diferentes concentrações de cada substância em estudo diluídos em DMSO/DPBS: mangiferina, naringenina, DHHB, octocrileno, metoxicinamato de etilexila e avobenzona, de acordo com o modelo apresentado na Figura 14. Cada experimento foi realizado em duplicata. Foram também analisadas as 12 diferentes associações em estudo, contendo a mesma proporção de filtros solares e antioxidantes utilizados nas formulações.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
C	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
D	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
E	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
F	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
G	B	CNT	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CNT	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 14- Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade. B= branco, contendo DPBS (não contém células, porém tratada com vermelho neutro e solução de dessorção). CNT= controle não tratado (contém células, porém não contém nenhuma substância em estudo).

As duas microplacas foram incubadas por 1 hora e, a seguir, uma delas foi submetida à radiação UVA de $6,3 \text{ mW/cm}^2$ por 13 minutos, emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 o que equivale a uma dose total de 5 J/cm^2 de radiação UVA, para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com DPBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas foram incubadas a 37°C por 20 horas. A seguir, $100 \mu\text{L}$ de meio DMEM contendo uma solução de $50 \mu\text{g/mL}$ do corante vital vermelho neutro foi adicionado em cada poço e as células incubadas por 3 horas a 37°C . Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por etanol/ água/ ácido acético foi acrescentada em cada poço.

Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi utilizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm em leitor de microplacas Bio-Tec Instruments, modelo μ Quant e os dados, analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo Zebet, Alemanha) para o cálculo do PIF (“photo irritation factor”- fator de fotoirritação) e do MPE (“mean photo effect”- foto efeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico.

O cálculo do PIF está relacionado com a EC50, ou seja, à concentração de cada substância que inibe 50% de viabilidade celular da placa não irradiada e da placa irradiada, como apresentado na equação a seguir:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)} \quad (\text{Equação 4})$$

O cálculo do MPE é baseado na comparação das curvas dose-resposta completas, como apresentado na equação a seguir:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{ci}}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que, o foto efeito (PE_{ci}) em qualquer concentração (C) é definido como o produto do efeito resposta (RE_c) e do efeito dose (DE_c), ou seja, PE_{ci}= RE_c x DE_c. O efeito resposta RE_c é a diferença entre as respostas observadas na ausência e presença de radiação, ou seja, RE_c= R_c (-Irr)- R_c (+Irr).

Modelo de predição:

De acordo com o guia de determinação de fototoxicidade número 432 da OECD (2004), uma substância que apresenta:

PIF < 2 ou MPE < 0,1 prediz: “nenhuma fototoxicidade”

PIF > 2 e < 5 ou MPE > 0,1 e < 0,15 prediz: “provavelmente fototóxico” e

PIF > 5 e MPE > 0,15 prediz: “fototóxico”.

5. Resultados

5.1. Testes preliminares de estabilidade

Após a centrifugação, todas as formulações que continham as bases A e B sem a adição dos antioxidantes, tanto no tempo zero quanto após 15 dias de armazenagem no ambiente e à 45°C foram consideradas estáveis, uma vez que apresentaram o mesmo aspecto, sem apresentar separação de fases. Entretanto, as formulações contendo a base autoemulsificante A acrescidas dos antioxidantes foram consideradas instáveis uma vez que houve separação de fases em todas as amostras após 15 dias de armazenagem, tanto quando mantidas no ambiente quanto quando submetidas à 45°C.

No teste de avaliação visual, todas as formulações, acrescidas ou não dos antioxidantes, foram consideradas aprovadas, uma vez que não houve alterações significativas nos parâmetros cor, separação de fases e homogeneidade, após 15 dias de armazenagem no ambiente e à 45°C.

O pH das formulações foi ajustado logo após o preparo, de maneira que o valor final estava no intervalo de 5,85 a 6,25. Em relação à avaliação do pH após 15 dias de estocagem, foi observado que não houve alterações significativas durante o período de análise, tanto quando as formulações foram mantidas no ambiente quanto quando submetidas à 45°C, sendo que praticamente todas formulações apresentaram pH levemente ácido, na faixa de 5,32 a 6,68.

As formulações acrescidas da associação de mangiferina e naringenina também tiveram o pH ajustado logo após o preparo, de maneira que o valor final estava no intervalo de 5,67 a 6,13. Após 15 dias de estocagem não foram observadas alterações significativas nos valores de pH, para as formulações mantidas à temperatura ambiente e submetidas à 45°C, apresentando valores entre 6,10 a 6,39 (Tabela 4).

Tabela 4- Valores de pH das formulações submetidas ao teste preliminar de estabilidade

Formulação	zero	15 dias	
		Tamb	45°C
FA1	6,00	5,32	5,88
FA2	6,02	6,06	6,39
FA3	5,85	6,46	6,68
FA1MN	5,67	6,20	6,30
FA2MN	6,00	6,28	6,39
FA3MN	6,08	6,30	6,26
FB1	5,89	6,30	6,40
FB2	6,14	6,28	6,39
FB3	6,25	6,30	6,26
FB1MN	5,92	6,10	6,27
FB2MN	6,10	6,20	6,34
FB3MN	6,13	6,10	6,30

5.2. Avaliação da fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes

5.2.1. Estudo de fotoestabilidade dos filtros solares e antioxidantes por CLAE

5.2.1.1. Padronização do método de CLAE

5.2.1.1.1. Linearidade

As curvas analíticas foram construídas a partir da análise de dados obtidos por CLAE conforme descrito no item 4.2.3.2.1. Os gráficos de cada substância com suas respectivas equações da reta e coeficientes de correlação (r) estão apresentados a seguir (Figura 15 a 20). Todas as substâncias apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99, o que nos permite afirmar que o método apresenta linearidade no intervalo de concentração avaliado (BRASIL, 2003).

Figura 15- Curva analítica da mangiferina

Figura 16- Curva analítica da naringenina

Figura 17- Curva analítica do DHHB

Figura 18- Curva analítica do octocrileno

Figura 19- Curva analítica do metoxicinamato de etilexila

Figura 20- Curva analítica da avobenzona

5.2.1.1.2. Seletividade

Os cromatogramas abaixo correspondem aos padrões de todas as substâncias em estudo, separadamente (Figura 21 A - F), ao branco do reagente (Figura 22 A), ao veículo das formulações (Figura 22 B) e aos padrões de todas as substâncias em estudo em uma mesma solução (Figura 22 C). Com base nos cromatogramas é possível afirmar que o método se mostrou seletivo para as substâncias analisadas.

Figura 21- Perfil cromatográfico dos padrões das substâncias em estudo. **(A):** Mangiferina (MGF), **(B):** Naringenina (NRG), **(C):** Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), **(D):** Octocrileno (OCT), **(E):** Metoxicinamato de etilexila (MTX), **(F):** Avobenzona (AVO). Condições cromatográficas: eluição gradiente com metanol: água com 2% de ácido acético, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹; coluna de fase reversa C18 (5µm), 250mm x 4mm; detecção 325 nm.

A) **B)** **C)**

Figura 22- Perfil cromatográfico do branco de reagente, ou seja, metanol **(A)**, da extração do veículo (formulação sem nenhum filtro solar ou antioxidante) **(B)** e dos filtros solares e antioxidantes em solução de metanol **(C)**. Picos: Mangiferina (MGF), Naringenina (NRG), Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), Octocrileno (OCT), Metoxicinamato de etilexila (MTX) e Avobenzona (AVO).

5.2.1.1.3. Precisão e exatidão

Os valores de precisão e exatidão/recuperação intra e inter-ensaio estão apresentados na Tabela 5, nos quais se pode observar que o método pode ser considerado preciso e exato, uma vez que os valores de precisão não ultrapassaram o limite de 5% estabelecido e os valores de exatidão mantiveram-se na faixa de 80-120% (BRASIL, 2003).

Tabela 5- Precisão e exatidão intra e inter-ensaio. MGF: mangiferina; NRG: naringenina; DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato; OCT: octocrileno; MTX: metoxicinamato de etilexila; AVO: avobenzona.

Substância	Intra-ensaio (n=6)				Inter-ensaio (n=9)		
	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão (%)	Concentração obtida± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão (%)
MGF	6,4	5,97± 0,08	1,34	93,28	5,92± 0,03	0,50	92,50
NRG	6,4	6,04± 0,26	4,30	94,37	5,94± 0,21	3,53	92,81
DHHB	80	83,91± 2,23	2,65	104,88	81,16± 3,04	3,74	101,45
OCT	96	99,20± 2,56	2,58	103,33	95,22± 4,58	4,81	99,18
MTX	128	133,56± 3,60	2,69	104,34	129,29± 4,60	3,55	101,00
AVO	64	64,94± 1,84	2,83	101,46	63,80± 1,66	2,60	99,68

5.2.1.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares e antioxidantes por CLAE

As Figuras 23 a 34 representam os cromatogramas das formulações em estudo, submetidas ou não à irradiação.

As concentrações remanescentes dos filtros solares e antioxidantes presentes nas formulações em estudo submetidas ou não à irradiação UVA estão apresentadas nas Tabelas 6 a 11 e nas Figuras 35 a 37.

A) **B)**

Figura 23- Cromatogramas da formulação FB1 quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

A) **B)**

Figura 24- Cromatogramas da formulação FB1M quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Figura 25- Cromatogramas da formulação FB1N quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: naringenina (NRG), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Figura 26- Cromatogramas da formulação FB1MN quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

A) **B)**

Figura 27- Cromatogramas da formulação FB2 quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX).

Figura 28- Cromatogramas da formulação FB2M quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX).

Figura 29- Cromatogramas da formulação FB2N quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX).

Figura 30- Cromatogramas da formulação FB2MN quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT) e metoxicinamato de etilexila (MTX).

A) **B)**

Figura 31- Cromatogramas da formulação FB3 quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Figura 32- Cromatogramas da formulação FB3M quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Figura 33- Cromatogramas da formulação FB3N quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Figura 34- Cromatogramas da formulação FB3MN quando submetida **(A)** ou não à irradiação **(B)**. Picos: mangiferina (MGF), naringenina (NRG), dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), octocrileno (OCT), metoxicinamato de etilexila (MTX) e avobenzona (AVO).

Tabela 6- Concentração remanescente da mangiferina

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1M	6,4	5,91	5,79	102,07	96,62
		5,64	5,88	95,91	
		5,79	6,30	91,90	
FB2M	6,4	5,05	5,61	90,01	89,37
		5,75	6,50	88,46	
		5,54	6,18	89,64	
FB3M	6,4	5,07	5,57	91,02	93,24
		5,31	5,60	94,82	
		5,23	5,57	93,89	
FB1MN	6,4	5,64	5,66	99,64	96,67
		5,43	5,87	92,50	
		5,57	5,69	97,89	
FB2MN	6,4	5,57	5,68	98,06	96,60
		5,46	5,94	91,92	
		5,99	6,00	99,83	
FB3MN	6,4	5,54	5,85	94,70	91,46
		5,34	5,89	90,66	
		5,27	5,92	89,02	

Tabela 7- Concentração remanescente da naringenina

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1N	6,4	6,37	7,12	89,08	89,70
		6,42	7,10	90,29	
		6,38	7,11	89,73	
FB2N		5,72	6,09	93,92	97,78
		6,07	6,02	100,83	
		6,38	6,47	98,60	
FB3N		6,25	5,69	109,84	102,76
		5,97	5,97	100,00	
		6,33	6,43	98,44	
FB1MN		5,66	5,33	106,19	103,58
		5,52	5,76	95,83	
		5,73	5,27	108,72	
FB2MN		5,75	5,87	97,95	98,56
		5,97	6,04	98,84	
		6,24	6,31	98,89	
FB3MN		5,66	5,98	94,64	97,14
		5,78	5,75	100,52	
		5,44	5,65	96,28	

Tabela 8- Concentração remanescente do DHHB

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB2		75,38	79,42	94,91	97,25
		76,27	80,21	95,08	
		83,43	81,98	101,76	
FB3		73,48	78,34	93,79	96,00
		77,41	78,18	99,01	
		78,05	81,98	95,20	
FB2M		75,55	77,79	97,12	97,32
		80,25	81,70	98,22	
		82,11	84,97	96,63	
FB3M	80	73,57	75,63	97,26	98,00
		75,47	76,41	98,76	
		74,73	76,28	97,96	
FB2N		73,56	80,30	91,60	96,42
		79,41	78,76	100,82	
		82,71	85,39	96,85	
FB3N		78,33	74,64	104,94	101,84
		76,93	76,68	100,32	
		79,02	78,81	100,26	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB2MN	80	77,93	80,59	96,69	98,56
		78,69	80,36	97,92	
		84,05	83,16	101,07	
FB3MN	80	79,68	78,45	101,56	96,23
		72,69	79,31	91,65	
		77,62	81,27	95,50	
conclusão					

Tabela 9- Concentração remanescente do octocrileno

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1	96	90,72	93,76	96,75	98,42
		94,04	94,51	99,50	
		94,30	95,23	99,02	
FB2	96	88,01	93,03	94,60	97,67
		89,28	92,34	96,68	
		97,46	95,78	101,75	
FB3	96	87,79	93,02	94,37	96,48
		89,43	89,65	99,75	
		93,44	98,01	95,33	
FB1M	96	92,79	91,12	101,83	97,89
		89,13	91,72	97,17	
		92,68	97,89	94,67	
FB2M	96	88,16	91,21	96,65	97,03
		93,91	95,84	97,98	
		96,07	99,58	96,47	
FB3M	96	86,19	88,26	97,65	97,93
		88,61	89,26	99,27	
		87,71	90,54	96,87	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1N	96	97,45	102,91	94,69	92,94
		96,62	104,81	92,18	
		96,61	105,04	91,97	
FB2N		86,07	93,88	91,68	96,44
		92,95	92,26	100,74	
		96,96	100,07	96,89	
FB3N		91,79	87,17	105,29	102,40
		90,45	89,56	100,99	
		92,85	91,98	100,94	
FB1MN	91,03	89,91	101,24	99,68	
	89,09	93,31	95,47		
	91,21	89,12	102,34		
FB2MN	91,40	94,15	97,08	98,78	
	92,16	93,81	98,24		
	98,31	97,31	101,02		
FB3MN	95,64	90,32	105,89	97,07	
	84,04	94,28	89,13		
	92,91	96,58	96,20		
					conclusão

Tabela 10- Concentração remanescente do metoxicinamato de etilexila

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1		110,50	129,00	85,65	87,71
		115,15	130,02	88,56	
		115,49	129,87	88,92	
FB2		109,99	127,33	86,38	88,96
		110,30	126,02	87,52	
		122,42	131,66	92,98	
FB3		105,50	125,23	84,24	85,64
		109,72	123,24	89,03	
		110,73	132,38	83,64	
FB1M	128	114,31	125,00	91,44	87,81
		109,83	125,88	87,25	
		113,89	134,41	84,73	
FB2M		111,29	126,37	88,07	88,41
		117,91	132,86	88,74	
		121,94	137,92	88,41	
FB3M		105,96	120,98	87,58	87,48
		107,28	122,00	87,93	
		106,52	122,52	86,94	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1N		118,96	138,76	85,73	83,75
		118,21	141,83	83,34	
		117,52	142,98	82,19	
FB2N		107,55	130,05	82,69	87,22
		116,12	127,80	90,86	
		121,91	138,34	88,12	
FB3N		109,71	120,00	91,42	89,75
		108,70	123,27	88,18	
		113,17	126,22	89,66	
FB1MN	128	111,91	123,67	90,49	89,11
		109,33	128,60	85,01	
		112,78	122,48	91,83	
FB2MN		115,32	129,82	88,83	90,71
		116,52	129,28	90,13	
		125,09	134,23	93,19	
FB3MN		117,15	125,12	93,63	86,82
		101,27	127,72	79,29	
		114,03	130,26	87,54	

conclusão

Tabela 11- Concentração remanescente da avobenzona

continua

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1		52,65	61,09	86,18	87,16
		55,00	63,37	86,79	
		55,15	62,29	88,53	
FB3		53,95	62,13	86,83	88,58
		57,00	62,15	91,71	
		56,88	65,22	87,21	
FB1M		54,86	63,31	86,65	83,34
		52,94	63,66	83,17	
		54,38	67,81	80,19	
FB3M	64	50,23	49,70	101,06	91,03
		49,35	60,21	81,96	
		48,32	53,64	90,08	
FB1N		56,94	70,77	80,45	78,32
		56,41	72,48	77,82	
		55,86	72,80	76,69	
FB3N		47,31	54,28	87,15	87,06
		51,18	59,32	86,27	
		55,77	63,52	87,79	

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração na lâmina irradiada (µg/mL)	Concentração na lâmina não irradiada (µg/mL)	Concentração remanescente após irradiação (%)	Média da concentração remanescente (%)
FB1MN	64	55,19	60,40	91,37	92,29
		55,76	60,03	92,88	
		57,17	61,71	92,64	
FB3MN		59,26	63,03	94,01	89,39
		53,67	63,20	84,92	
		57,30	64,19	89,26	
					conclusão

A análise estatística dos resultados de fotoestabilidade por CLAE, pelo teste paramétrico Análise de Variância, mostrou que as substâncias em estudo foram fotoinstáveis, com exceção da mangiferina, octocrileno e DHHB, os quais apresentaram porcentagem remanescente média em torno de 98% (Figuras 35 A e 36). Já os valores encontrados para a naringenina, o metoxicinamato de etil-hexila e a avobenzona, nas formulações não irradiadas e irradiadas, foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,001$) sendo que foi observada redução significativa da porcentagem remanescente dessas substâncias, em torno de 86%, após a irradiação (Figuras 35 B e 37).

Ao analisar a influência das diferentes associações de filtros solares (associações 1, 2 e 3) na fotoestabilidade das substâncias em estudo, observou-se que a formulação FB1N que continha avobenzona associada à naringenina, apresentou maior degradação, tanto quando analisada em função da porcentagem remanescente de avobenzona (aproximadamente 78%), (Figura 37 B) quanto em relação à porcentagem remanescente de naringenina (aproximadamente 90%) (Figura 35 B). Os valores de porcentagem remanescente referentes às formulações contendo as demais associações foram de aproximadamente 90% para a avobenzona e de 100% para a naringenina.

A adição da mangiferina a essa associação (FB1MN) promoveu uma melhora significativa da fotoestabilidade tanto da naringenina (Figura 35 B) quanto da avobenzona (Figura 37 B), uma vez que as porcentagens remanescentes de ambas as substâncias na FB1MN, foram estatisticamente maiores que na FB1N, que continha apenas a naringenina ($p < 0,05$).

Observou-se ainda um aumento da fotoestabilidade da naringenina quando esta estava presente na formulação (FB3N), que continha avobenzona e DHHB, quanto comparada à mesma formulação (FB1N) que continha somente avobenzona ($p < 0,05$) (Figura 35 B).

Já em relação ao metoxicinamato de etilexila, embora tenha sido observada redução significativa da porcentagem remanescente dessa substância frente à exposição ao UV, não houve influência das diferentes associações de filtros solares e antioxidantes nos valores encontrados (Figura 37 A).

A)

B)

Figura 35- Porcentagem remanescente da mangiferina **(A)** e naringenina **(B)** nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão).

• estatisticamente diferente da formulação FB1N ($p < 0,05$).

A)

B)

Figura 36- Porcentagem remanescente do DHHB (A) e octocrileno (B) nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FB), filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão).

Figura 37- Porcentagem remanescente da metoxicinamato de etilexila **(A)** e avobenzona **(B)** nas formulações em estudo, após irradiação por UVA, contendo: filtros solares (FB), filtros solares acrescidos de mangiferina (FBM), filtros solares acrescidos de naringenina (FBN) e filtros solares acrescidos de mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão).

• estatisticamente diferente da formulação FB1N ($p < 0,05$).

5.2.2. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

As Figuras 38 e 39 representam os espectros de varredura no UV (290-320 nm) das formulações em estudo, quando submetidas ou não à irradiação.

Os valores da integral do espectro de absorção obtidos após a varredura na faixa da radiação UVA/UVB, bem como os valores de razão UVA/UVB das formulações em estudo, submetidas ou não à irradiação estão apresentados na Tabela 12 e o gráfico da razão UVA/UVB dessas mesmas formulações está apresentado na Figura 40.

A)

B)

Figura 38- Espectro de varredura no UV (290-400 nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo as associações 1, 2 e 3 de filtros solares **(A)**: Formulações FB, ou seja, contendo apenas os filtros solares. **(B)**: Formulações FBM, ou seja, contendo filtros solares e mangiferina.

A)

B)

Figura 39- Espectro de varredura no UV (290-400 nm) das formulações irradiadas e não irradiadas contendo as associações 1, 2 e 3 de filtros solares **(A)**: Formulações FBN, ou seja, contendo filtros solares e naringenina. **(B)**: Formulações FBMN, ou seja, contendo filtros solares, mangiferina e naringenina.

Tabela 12- Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação.

Formulação	Integral UVA (320-400 nm)		Integral UVB (290-320 nm)		Razão UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB
	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	
FB1	41,88	45,11	39,55	40,25	1,05	1,12	0,06
	41,36	45,49	39,84	40,84	1,03	1,11	0,07
	41,13	45,26	38,87	40,27	1,05	1,12	0,06
FB2	40,29	41,10	37,02	38,89	1,08	1,05	-0,02
	39,79	40,97	36,69	38,84	1,08	1,05	-0,02
	40,97	44,73	38,84	41,23	1,05	1,08	0,02
FB3	73,57	80,06	42,91	45,03	1,71	1,77	0,03
	71,81	86,17	41,80	50,47	1,71	1,70	0,00
	73,09	84,85	42,74	49,82	1,71	1,70	0,00
FB1M	47,78	38,00	42,12	31,50	1,13	1,20	0,05
	47,14	35,84	41,71	29,43	1,12	1,21	0,07
	45,98	37,51	41,71	30,89	1,10	1,21	0,09
FB2M	45,12	47,38	41,77	44,72	1,08	1,05	-0,02
	44,43	46,08	41,30	43,37	1,07	1,06	-0,01
	42,52	46,17	39,35	43,71	1,08	1,05	-0,02
FB3M	68,62	68,41	39,27	39,44	1,74	1,73	0,00
	78,12	76,15	44,72	43,98	1,74	1,73	0,00
	80,64	79,18	46,36	45,69	1,73	1,73	0,00
FB1N	50,25	56,07	46,18	48,61	1,08	1,15	0,06
	48,86	54,16	44,84	47,45	1,08	1,14	0,05
	50,25	56,74	46,18	48,79	1,08	1,16	0,06
FB2N	41,56	42,81	39,50	41,81	1,05	1,02	-0,03
	41,40	43,70	39,46	42,67	1,04	1,02	-0,02
	40,30	44,76	38,39	43,67	1,04	1,02	-0,02
FB3N	69,76	72,93	40,94	43,17	1,70	1,68	-0,01
	69,73	71,42	40,86	42,32	1,70	1,68	-0,01
	70,44	74,21	41,17	44,05	1,71	1,68	-0,01
FB1MN	36,84	32,91	36,66	32,10	1,00	1,02	0,01
	36,12	40,58	35,88	39,27	1,00	1,03	0,02
	36,48	39,49	36,18	38,44	1,00	1,02	0,01
FB2MN	43,58	44,02	40,95	41,90	1,06	1,05	0,00
	43,72	43,02	40,93	41,40	1,06	1,04	-0,02
	43,25	43,72	40,51	41,79	1,06	1,04	-0,02
FB3MN	69,85	85,01	40,51	50,10	1,72	1,69	-0,01
	79,20	82,75	46,10	48,63	1,71	1,70	0,00
	82,21	87,95	47,77	52,02	1,72	1,69	-0,01

Quando os valores da razão UVA/UVB foram analisados, podemos observar que a maioria das formulações fotoprotetoras foram consideradas fotoestáveis, uma vez que não apresentaram redução significativa na razão UVA/UVB após irradiação quando comparadas com seus respectivos pares não irradiados. Exceto as formulações contendo a associação 1 de filtros solares sem adição dos antioxidantes (FB1), acrescidas de mangiferina (FB1M) e naringenina (FB1N) que apresentaram valores estatisticamente menores que seu controle não irradiado ($p < 0,001$) (Figura 40 e Tabela 12). Apesar disso, a razão UVA/UVB se manteve elevada em todas as formulações irradiadas.

Entretanto, a formulação contendo a associação 1 de filtros solares acrescidas de mangiferina e naringenina (FB1MN), não apresentou redução significativa na razão UVA/UVB (Figura 40), o que nos leva a sugerir que, nesse caso, a associação da mangiferina e naringenina é vantajosa, uma vez que proporcionou uma melhora da fotoestabilidade das formulações com relação àquelas que não continham os antioxidantes (FB1) ou que os continham isoladamente (FB1M e FB1N).

Todas as formulações contendo as associações 2 e 3, ou seja, que continham DHHB, foram consideradas fotoestáveis, sendo que a adição de mangiferina e naringenina não influenciou na fotoestabilidade (Figura 40) .

Ao compararmos os valores da razão UVA/UVB das formulações submetidas ou não à irradiação, contendo a associação 1 de filtros solares com seus correspondentes que apresentavam DHHB (associação 2) foi observado que não houve diferença estatística significativa quanto à razão UVA/UVB, ou seja, as formulações foram consideradas estatisticamente equivalentes. No entanto, quando os valores da razão UVA/UVB das formulações contendo a associação 3 de filtros solares foram comparados às formulações contendo as associações 1 e 2, foi observado um aumento pronunciado da razão UVA/UVB (de aproximadamente 70%) e estatisticamente significativo quando a associação 3 foi comparada às demais ($p < 0,001$) (Figuras 38, 39 e 40).

Desta forma, podemos observar que a avobenzona e o DHHB, quando utilizados na associação 3 de filtros solares proporcionaram um aumento pronunciado da proteção frente à radiação UVA, do que quando utilizados isoladamente, nas associações 1 e 2, respectivamente.

Figura 40- Razão UVA/UVB de todas as formulações em estudo, irradiadas (barra com textura) e não irradiadas, contendo: filtros solares (FB), filtros solares e mangiferina (FBM), filtros solares e naringenina (FBN) e filtros solares e mangiferina e naringenina (FBMN). Teste ANOVA, n=3 (média e desvio padrão).

Δ estatisticamente diferente do respectivo controle não irradiado ($p < 0,001$).

* estatisticamente diferente da mesma formulação, irradiada ou não irradiada contendo a associação 1 de filtros solares ($p < 0,001$).

° estatisticamente diferente da mesma formulação, irradiada ou não irradiada contendo a associação 2 de filtros solares ($p < 0,001$).

5.3. Avaliação da fototoxicidade

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade à radiação estão apresentados na Tabela 13, na qual se pode observar que as células apresentam viabilidade dentro dos critérios de aceitação determinados no estudo de validação, ou seja, uma viabilidade celular de pelo menos 80% quando as células foram submetidas a uma dose de 5 J/cm^2 .

Tabela 13- Sensibilidade dos fibroblastos à radiação UVA

Dose (J/cm²)	Viabilidade Celular (% em relação ao – UVA)
3	93,6
5	81,6
9	72,4

5.3.1. Análise das substâncias isoladas

Dentre as substâncias analisadas isoladamente, a avobenzona e o DHHB apresentaram potencial fototóxico, uma vez que obtiveram MPE maior que 0,15 (avobenzona: 0,227 e 0,326), (DHHB: 0,182; 0,211 e 0,172), os quais estão acima dos limites aceitáveis para substâncias consideradas não fototóxicas (Tabela 14, Figura 41).

Segundo os critérios de aceitação determinados no estudo de validação do método (OECD, 2004), os controles também apresentaram valores aceitáveis: controle positivo norfloxacin MPE: 0,476 e 0,500 (OECD: 0,34-0,90), e o controle negativo L-histidina MPE: 0,064 (OECD: 0,05-0,10) (Tabela 14, Figura 41).

Tabela 14- Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N=2).

Substância	MPE	EC50 (-UV) µg/mL	EC50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
Mangiferina	0,005	ND	ND	1,031	Não fototóxico
	-0,203	ND	ND	1,000	
Naringenina	0,020	ND	ND	1,081	Não fototóxico
	-0,040	75,093	69,515	1,081	
DHHB	0,182^b	73,231	20,511	3,591	Fototóxico
	0,211^b	14,028	1,821	8,748	
	0,172^b	ND	39,890	1,453	
Octocrileno	0,011	ND	ND	1,000	Não fototóxico
	-0,342	ND	ND	1,000	
Metoxicinamato de etilexila	-0,143	ND	ND	1,000	Não fototóxico
	-0,065	ND	ND	1,000	
Avobenzona	0,227^b	69,84	12,15	5,760	Fototóxico
	0,326^b	39,414	11,529	3,493	
L-histidina (controle -)	-0,064	ND	ND	1,000	Não fototóxico
Norfloxacina (controle +)	0,500^b	ND	30,917	3,24	Fototóxico

Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. ^a: provavelmente fototóxico, ^b: fototóxico. ND: não determinável

A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das substâncias (Figura 41) em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas, as quais foram obtidas pelo Software Phototox versão 2.0.

Figura 41- Curvas dose-resposta das substâncias em estudo, classificadas como fototóxicas e não fototóxicas (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0).

5.3.2. Análise das associações das substâncias em estudo

Os resultados obtidos na avaliação da fototoxicidade das associações em estudo estão apresentados na Tabela 15.

Quando as associações contendo avobenzona (associação 1) foram analisadas, foram observados valores de MPE abaixo do limite de fototoxicidade, para a A1, que apresentava somente filtros solares e para a A1M, contendo filtros solares e mangiferina (A1: 0,006 e 0,042; A1M: 0,004 e -0,000). Entretanto, quando a naringenina foi adicionada a essa associação (A1N) houve um aumento dos valores de MPE, o que classifica essa formulação como fototóxica (A1N: 0,105; 0,213 e 0,162). Por outro lado, a combinação de avobenzona, mangiferina e naringenina (A1MN) não apresentou potencial fototóxico (A1MN: -0,004; 0,036), o que nos sugere que a mangiferina presente nessa associação proporcionou uma diminuição do potencial fototóxico da A1N (Tabela 15, Figura 42).

Quando as associações que continham somente DHHB (A2, A2M, A2N e A2MN) foram analisadas, foi observado que nenhuma apresentou potencial fototóxico, uma vez que apresentaram valores de MPE dentro da faixa aceitável para substâncias não fototóxicas (Tabela 15, Figura 42).

Em relação às associações que continham avobenzona e DHHB (A3, A3M, A3N e A3MN) foi observado que todas as formulações não apresentaram potencial fototóxico ($MPE < 0,06$), exceto a associação contendo naringenina (A3N) que apresentou um aumento do potencial fototóxico, uma vez que apresentou valores de MPE acima dos limites aceitáveis (A3N: 0,199 e 0,191). Além disso, a associação de avobenzona, DHHB, mangiferina e naringenina (A3MN) não apresentou potencial fototóxico, o que nos sugere que a mangiferina também proporcionou uma redução do potencial fototóxico com relação a A3N. Efeito semelhante ao encontrado para a associação 1 (Tabela 15, Figura 42).

Tabela 15- Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo, em cultura de fibroblastos (N=2).

Associação	MPE	EC50 (-UV) µg/mL	EC50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
A1	0,006 0,042	6,235 60,919	8,014 31,182	0,787 1,955	Não fototóxico
A1M	0,004 -0,000	43,152 27,789	30,467 30,129	1,432 0,930	Não fototóxico
A1N	0,105^a 0,213^b 0,162^b	8,700 ND 26,535	1,641 ND 8,984	6,972 1,017 2,975	Fototóxico
A1MN	-0,004 0,036	28,697 47,600	25,471 42,799	1,162 1,145	Não fototóxico
A2	-0,186 -0,180	45,470 23,345	ND 77,916	1,000 0,301	Não fototóxico
A2M	0,002 -0,043	0,970 35,620	27,780 ND	ND 0,511	Não fototóxico
A2N	-0,023 0,005	ND ND	ND 77,056	1,000 1,257	Não fototóxico
A2MN	0,049 0,006	52,569 9,33	35,800 9,33	1,479 1,796	Não fototóxico
A3	-0,007 -0,213	39,368 42,214	32,070 ND	1,229 0,709	Não fototóxico
A3M	-0,000 0,061	ND ND	ND 27,469	1,162 1,771	Não fototóxico
A3N	0,199^b 0,191^b	31,002 35,101	2,607 10,861	13,656 3,236	Fototóxico
A3MN	0,003 -0,067	33,744 31,107	30,306 62,061	1,128 0,502	Não fototóxico

Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. ^a: provavelmente fototóxico, ^b: fototóxico. ND: Não determinável

A seguir estão representadas as curvas dose-resposta das associações em estudo (Figura 42), classificadas como fototóxicas e não fototóxicas, as quais foram obtidas pelo Software Phototox versão 2.0.

(A) FB1 (não fototóxico)

(B) FB1M (não fototóxico)

(C) FB1N (fototóxico)

(D) FB1MN (não fototóxico)

(E) FB2 (não fototóxico)

(F) FB2M (não fototóxico)

(G) FB2N (não fototóxico)

(H) FB2MN (não fototóxico)

(I) FB3 (não fototóxico)

(J) FB3M (não fototóxico)

(K) FB3N (fototóxico)

(L) FB3MN (não fototóxico)

Figura 42- Curvas dose-resposta das associações em estudo classificados como fototóxicos e não fototóxicos (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.)

6. Discussão

O uso regular de filtros solares apresenta um papel fundamental na redução dos danos causados pela exposição ao Sol, no entanto, é necessário que eles proporcionem uma proteção adequada frente às radiações UVA e UVB (VELASCO et al., 2008; WANG; BALAGULA; OSTERWALDER, 2010). Além disso, os formuladores devem ter conhecimento sobre a estrutura química e reatividade desses filtros, a fim de evitar possíveis incompatibilidades e reações de fotodegradação, as quais podem comprometer a eficácia e segurança dos mesmos (SHAATH, 2010).

No presente estudo, foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras contendo três diferentes associações dos filtros solares: avobenzona, DHHB, metoxicinamato de etilexila e octocrileno, os quais foram selecionados baseando-se em pesquisas de mercado e literatura técnico-científica.

A avobenzona é um filtro solar que proporciona proteção efetiva contra a radiação UVA, com pico máximo de absorção em 357 nm e elevado coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 34140 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Apesar disso, está sujeita a reações de fotodegradação, o que acarreta na diminuição de sua eficácia fotoprotetora e geração de fotoprodutos (SHAATH, 2010; KOCKLER et al., 2012). O metoxicinamato de etilexila, por sua vez, é o filtro solar mais utilizado no mundo. Apresenta absorção na região do UVB, com pico máximo de absorção em 311 nm (SHAATH, 2010).

Já o DHHB é um filtro solar que apresenta absorção na região do UVA, com pico máximo de absorção em 354 nm e elevado coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon = 35900 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Foi introduzido no mercado a fim de substituir a avobenzona, uma vez que apresenta fotoestabilidade (TUCHINDA et al., 2006; PUGLIA et al., 2014).

Considerando que a associação de diferentes filtros solares pode tanto proporcionar sinergismo entre as moléculas, resultando em uma melhora da performance do fotoprotetor, quanto promover incompatibilidades, as quais podem levar à reações de degradação, (LHIAUBET-VALLET et al., 2010) o presente estudo avaliou três diferentes associações diferentes de filtros solares. A primeira associação continha avobenzona, metoxicinamato de etilexila e octocrileno e, foi selecionada, por conter o filtro solar avobenzona e o octocrileno, um filtro UVB e fotoestabilizador da avobenzona, bastante comum em diversas formulações do mercado, porém considerado não muito efetivo quando associado a algumas

substâncias antioxidantes (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007; FREITAS; SÁ; GASPAR, 2013). Já a outra associação foi acrescida de DHHB para avaliar os efeitos desse filtro solar na fotoestabilidade da combinação avobenzona, metoxicinamato de etilexila e octocrileno (associação 3), uma vez que estes, ainda, não são conhecidos. Por fim, a última associação continha DHHB, metoxicinamato de etilexila, octocrileno, com o propósito de avaliar fotoestabilidade dessa combinação, quando o DHHB, inicialmente proposto para substituir a avobenzona, é utilizado isoladamente (associação 2).

Atualmente tem-se observado uma tendência em se associar substâncias com potencial antioxidante aos filtros solares convencionais, com o propósito de otimizar a eficácia fotoprotetora. O organismo dispõe de um sistema antioxidante eficiente capaz de combater as EROs formadas na pele, no entanto, a exposição excessiva à radiação UV pode resultar em uma depleção do mesmo, o que resulta no estresse oxidativo, que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças (BARBOSA et al., 2010; VERSCHOOTEN et al., 2006; NICHOLS; KATIYAR, 2010; AFAQ, 2011).

Além disso, considerando que a utilização de formulações contendo filtros solares não bloqueia 100% da radiação UV que incide sobre a pele e que as moléculas atualmente disponíveis no mercado não são completamente eficientes em neutralizar os radicais livres gerados após a fotofragmentação da avobenzona, a adição de antioxidantes em fotoprotetores é uma estratégia extremamente interessante para ampliar a fotoproteção (BRASIL 2012; CHATELAIN; GABARD, 2001; SCALIA; MEZZENA, 2010).

Recentemente, pesquisadores demonstraram que a melanina presente na pele pode induzir danos no DNA, por pelo menos três horas após a exposição direta à radiação UV, fenômeno conhecido como fotoquímica do escuro, o que corrobora ainda mais com a necessidade de se associar antioxidantes a filtros solares, a fim de oferecer duas linhas de defesa diferentes e complementares (PREMI et al., 2015).

Um estudo realizado por Wu e colaboradores (2011) demonstrou que formulações fotoprotetoras que continham associação de filtros solares com compostos antioxidantes, tais como vitamina C e E, extratos de camomila e de *Echnacea pallida* e cafeína proporcionaram uma proteção significativamente maior contra a indução de metaloproteinases-9 (MMP-9), pigmentação solar e de marcadores associados à hiperproliferação da epiderme, quando comparados aos

filtros e antioxidantes utilizados isoladamente.

Os polifenóis utilizados no presente estudo foram selecionados com base em suas propriedades biológicas, descritas na literatura, como atividade antioxidante e antiinflamatória e por apresentarem alta absorção na região do UVB e UVA, o que os tornam bons candidatos a filtros solares biológicos (PETROVA et al., 2011; DAS et al., 2012; RAZA et al., 2013). No entanto, até o momento, não existem informações disponíveis quanto à utilização desses compostos em formulações fotoprotetoras, bem como estudos que avaliem a fotoestabilidade e fototoxicidade dos mesmos. Levando em consideração que os polifenóis mangiferina e naringenina apresentaram potencial fotoprotetor, torna-se importante a realização desses testes para a obtenção de dados referentes à segurança e eficácia.

A concentração dos polifenóis utilizada nas formulações, de 0,4%, foi escolhida baseada em dados disponíveis na literatura científica (PETROVA et al., 2011; SAIJA, et al., 1998; BONINA et al., 1996).

As bases autoemulsificantes utilizadas no preparo das formulações foram selecionadas com base na literatura técnico-científica e ambas são indicadas para o desenvolvimento de fotoprotetores. A base autoemulsificante A (álcool cetearílico, fosfato de dicetila e fosfato cetet-10) apresenta alta compatibilidade com a pele, além de conferir hidrorresistência aos fotoprotetores (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003). Já a base autoemulsificante B (álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico) é estável frente a uma ampla faixa de temperatura e pH, o que permite a incorporação de ativos com características bem distintas.

Durante o desenvolvimento de um produto cosmético, a ANVISA recomenda que sejam realizados alguns testes para a avaliação da estabilidade do mesmo. Esses estudos contribuem para orientar o desenvolvimento e aperfeiçoamento de uma formulação, estimar o prazo de validade e auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a segurança e eficácia. Dentre os estudos realizados, o teste preliminar de estabilidade deve ser conduzido na fase inicial do desenvolvimento de um produto, empregando condições extremas de temperatura, no sentido de auxiliar na triagem das formulações (BRASIL, 2004).

Dessa forma, após o desenvolvimento das formulações, as mesmas foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade por determinação do pH, centrifugação e análise visual durante 15 dias quando mantidas no ambiente e

quando armazenadas à 45°C. Com relação aos valores de pH, foi observado que as formulações, após 15 dias de armazenagem, apresentaram valores entre 5,32 a 6,68, os quais são considerados compatíveis com o pH da pele (RODRIGUES, 1997). A análise visual das formulações demonstrou que não houve alterações quanto à cor, homogeneidade e separação de fases.

Após centrifugação, todas as formulações elaboradas com as bases autoemulsificantes A e B, sem a adição dos antioxidantes, foram consideradas estáveis, uma vez que não apresentaram separação de fases. Entretanto, as formulações elaboradas com a base autoemulsificante A adicionadas dos antioxidantes apresentaram separação de fases após 15 dias de armazenagem, tanto quando mantidas no ambiente quanto à 45°C, o que sugere uma possível incompatibilidade entre a base autoemulsificante A e os antioxidantes em estudo.

Considerando que as formulações contendo a base autoemulsificante B foram estáveis frente a todos os critérios analisados (pH, análise visual e centrifugação), essa base foi selecionada para elaboração das formulações submetidas ao estudo de fotoestabilidade.

A avaliação da fotoestabilidade, na área de fotoproteção, é considerada de grande relevância, uma vez que as reações de degradação dos filtros solares podem resultar na perda da capacidade absorviva e/ou formação de subprodutos tóxicos ou alérgicos, os quais representam um risco para a saúde do consumidor (CHATELAIN; GABARD, 2001; KOCKLER, 2012). Portanto, a utilização de associações de filtros solares fotoestáveis e/ou de moléculas fotoestabilizadoras é importante para garantir tanto a eficácia quanto a segurança das formulações fotoprotetoras (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados com a padronização das condições cromatográficas para a separação e análise dos seis filtros solares e dois antioxidantes objetos de estudo. Baseando-se nos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa e por outros descritos na literatura (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007; KANAZE et al., 2004; SAIJA et al., 1998; DAI et al., 2004; SOUZA et al., 2013; NYEBORG et al., 2010) foram empregadas diferentes fases móveis para melhorar a resolução dos picos e possibilitar a quantificação simultânea dos mesmos.

A partir dos resultados obtidos foi observado que a fase móvel e o gradiente que proporcionaram melhor separação das substâncias em estudo foi eluição inicial

constante de metanol: água com 2% de ácido acético (5:95) por 2 minutos, seguido por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol: água com 2% de ácido acético (40:60) por 10 minutos, seguido por outro gradiente linear de 1 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol: água com 2% de ácido acético (85:15) por 25 minutos.

O comprimento de onda empregado para a detecção dos filtros solares e antioxidantes foi de 325 nm, uma vez que, após pesquisa na literatura e análise das soluções em espectrofotômetro, foi observado que todas as substâncias apresentavam boa absorção nesse comprimento de onda, comumente utilizado para análise de filtros solares (KIM et al., 2011; FREITAS et al., 2015; WHARTON et al., 2011).

Após a determinação das condições cromatográficas, foram realizados testes para avaliar a linearidade, seletividade, precisão e exatidão intra e inter-ensaio do método desenvolvido. Os resultados obtidos demonstraram que o método está de acordo com os critérios preconizados pela ANVISA (BRASIL, 2003) quanto à seletividade, uma vez que o veículo das formulações e o solvente utilizado não apresentaram interferência. Foi também considerado adequado quanto aos parâmetros de linearidade ($r > 0,99$), precisão ($CV < 5\%$), e exatidão (80-120%).

Os resultados do estudo de fotoestabilidade por CLAE demonstraram que a mangiferina, o octocrileno e o DHHB foram considerados fotoestáveis, uma vez que não sofreram degradação significativa após irradiação por UVA, em todas as formulações estudadas. Esses resultados estão de acordo com os estudos obtidos da literatura, os quais obtiveram porcentagens remanescentes em torno de 100% para esses filtros solares (LHIAUBET-VALLET et al., 2010; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; DAMIANI et al., 2007).

No entanto, a naringenina, metoxicinamato de etilexila e a avobenzona, sofreram degradação significativa após exposição à radiação, o que resultou na redução de suas porcentagens remanescentes. A fotodegradação do metoxicinamato de etilexila pode ter ocorrido devido a fotoisomerização *cis/trans* que esta molécula está sujeita a sofrer, de forma que o isômero *cis*, formado após a absorção da radiação, apresenta coeficiente de absorvidade molar muito inferior ($\epsilon = 10.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ao isômero *trans* ($\epsilon = 19.500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), o que pode levar à redução da sua capacidade absorviva (SHAATH, 2010).

Já a redução da porcentagem remanescente da avobenzona se relaciona com a capacidade dessa molécula em sofrer tautomerização ceto-enólica, que por sua vez leva à formação do tautômero cetona que apresenta absorção na região UVC, entre 260 a 280 nm (LHIAUBET-VALLET, et al., 2010; CHATELAIN; GABARD, 2001). Embora a associação de avobenzona e metoxicinamato de etilexila seja considerada de amplo espectro, estes filtros solares, quando expostos à radiação UV, reagem entre si levando a formação de produtos de cicloadição, os quais comprometem a eficácia fotoprotetora (KIKUCHI et al., 2013).

Um estudo realizado por Lhiaubet-Vallet e colaboradores (2010), demonstrou que as porcentagens remanescentes da avobenzona e metoxicinamato de etilexila, quando analisados isoladamente, eram de respectivamente, 44% e 72%; no entanto, a associação desses dois filtros solares levou à diminuição da porcentagem remanescente do metoxicinamato de etilexila.

Ao analisar a influência das diferentes associações de filtros solares na fotoestabilidade das substâncias em estudo, foi observado que tanto a naringenina quanto a avobenzona apresentaram maior fotodegradação quando presentes na formulação FB1N. A adição de mangiferina a essa associação (FB1MN) resultou na melhora da fotoestabilidade de ambas as substâncias.

Como descrito anteriormente, a avobenzona é uma molécula que está sujeita a sofrer tautomerização ceto-enólica. A presença da radiação UV desloca o equilíbrio ceto-enólico no sentido de formação da forma cetona, a qual apresenta absorção na região do UVC, perdendo a eficácia fotoprotetora (LHIAUBET-VALLET et al., 2010). Além disso, a forma cetona pode absorver fótons e ser excitada para o estado tripleto, o qual é responsável pela maioria dos efeitos nocivos da avobenzona. Nesse estado pode haver transferência de energia para o oxigênio molecular e levar à formação do oxigênio singleto, que por sua vez, é altamente reativo e responsável por provocar danos oxidativos em biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA (SHAATH, 2010; KOCKLER et al., 2012).

Com relação à mangiferina, esta substância apresenta ampla absorção na faixa do UV (CANUTO et al., 2009; KAWAKAMI et al., 2013). Diversos estudos demonstraram sua elevada atividade antioxidante, capacidade sequestradora do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), atividade quelante do íon ferro, o que implica na prevenção da peroxidação lipídica induzida por ferro. Além disso,

apresenta um papel fundamental na neutralização do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (ESPARZA et al., 2009; JAGETIA; VENKATESHA, 2005; MASIBO; HE, 2008).

A naringenina, por sua vez, é uma flavonona amplamente encontrada em frutas cítricas, que apresenta absorção na região do UVB. (PATEL; SINGH; PATEL, 2014). Esse composto apresenta elevada atividade antioxidante, capacidade sequestradora do ânion superóxido e radical hidroxil, protege o DNA contra lesões e atua como quelante do íon ferro (CAVIA-SAIZ et al., 2010). No entanto, embora muitos estudos tenham demonstrado esses efeitos benéficos, alguns autores observaram baixa atividade antioxidante, baixo efeito na inibição da peroxidação lipídica, redução da atividade da enzima glutathione (antioxidante endógeno) (STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014; PROCHAZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011) e até mesmo ação pró-oxidante (MIRANDA et al., 2000; SAHU et al., 1997; YEN et al., 2003; GALATI et al., 2002).

No presente estudo, sugere-se que a avobenzona, quando presente na formulação FB1N, sofreu reações de degradação, levando à formação de fotoprodutos, os quais provavelmente podem ter interagido com a naringenina, e ocasionado a sua fotodegradação. Uma possível explicação para esse resultado seria que a adição de mangiferina a essa associação (FB1MN) pode ter promovido a fotoestabilização da avobenzona, devido a elevada atividade antioxidante da mangiferina (ESPARZA et al., 2009; JAGETIA; VENKATESHA, 2005; MASIBO; HE, 2008), o que resultou em redução de EROs disponíveis para interagir com a naringenina e provocar sua fotodegradação. Consequentemente, sugere-se que ambas as moléculas foram estabilizadas. Entretanto, são necessários estudos tais como a avaliação dos produtos de degradação por espectrometria de massas para corroborar com os mecanismos propostos. Além disso, por apresentar absorção na faixa do UV, e coeficiente de absorvidade molar de $6950 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $6211 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para comprimentos de onda de 320 e 368 nm, respectivamente, pode ter agido por meio da competição pela absorção de fótons (CANUTO, et al., 2009; KAWAKAMI, et al., 2013).

Um estudo realizado por Scalia e Mezzena (2010) demonstrou a capacidade da quercetina em reduzir significativamente a fotodegradação da combinação de avobenzona e metoxicinamato de etilexila, após ser submetida à irradiação. O efeito fotoestabilizador promovido por esse flavonóide não foi atribuído somente a sua elevada atividade antioxidante, como também por sua habilidade em neutralizar o

estado excitado tripleto desses filtros solares, diminuindo as chances de ocorrerem reações químicas irreversíveis com essas moléculas.

Não foi observada degradação significativa da naringenina quando as formulações contendo a associação 2 (DHBB em associação com o metoxicinamato de etilexila e octocrileno) foram submetidas à irradiação, o que mostra que o DHBB pode ser indicado para formulações fotoprotetoras contendo tais associações.

Um outro ponto levantado no presente projeto foi a viabilidade de se associar o DHBB à avobenzona (associação 3) para reduzir a fotodegradação da mesma. Foi observado que a naringenina apresentou um aumento de sua fotoestabilidade quando presente na formulação FB3N, que continha avobenzona e DHBB, quanto comparada à mesma formulação (FB1N) que continha somente avobenzona. Assim, pode ser sugerido que o DHBB promoveu melhora da fotoestabilidade da naringenina quando presente na formulação FB3N, mas o mesmo não ocorreu com a avobenzona.

O provável mecanismo de fotoestabilização da naringenina pelo DHBB, um derivado da benzofenona-3, pode estar relacionado à capacidade deste filtro solar agir como *quencher* do estado excitado singleto, uma vez que esse mecanismo de fotoestabilização já é descrito na literatura para a benzofenona-3 (SHAATH, 2010).

Nos estudos de fotoestabilidade, enquanto a análise por CLAE permite avaliar o perfil individual de cada molécula utilizada no fotoprotetor, a análise por espectrofotometria avalia esse parâmetro levando em consideração a formulação como um todo, uma vez que o espectro de absorção obtido é resultado da absorção de todas as moléculas presentes na formulação. Dessa forma, a associação do estudo de fotoestabilidade por CLAE e espectrofotometria é de fundamental importância para a obtenção de dados mais completos e detalhados (STOKES; DIFFEY, 1999).

O estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV mostrou que todas as formulações fotoprotetoras não apresentaram redução significativa na razão UVA/UVB após irradiação, foram consideradas, portanto, fotoestáveis. Somente as formulações contendo a associação 1 de filtros solares sem adição dos antioxidantes (FB1), acrescida de mangiferina (FB1M) e de naringenina (FB1N) que apresentaram redução significativa na razão UVA/UVB.

Apesar disso, a formulação contendo a associação 1 de filtros solares acrescida da associação de mangiferina e naringenina (FB1MN) foi considerada

fotoestável, uma vez que não apresentou redução significativa na razão UVA/UVB após irradiação. Dessa forma, pode-se sugerir que mangiferina e naringenina, quando utilizadas em combinação promoveram uma melhora da fotoestabilidade das formulações em comparação àquelas que não continham antioxidantes (FB1) ou que os continham, isoladamente, (FB1M e FB1N).

Foi também observado que todas as formulações que apresentavam o DHHB, ou seja, as formulações contendo a associação 2 e 3 de filtros solares, foram consideradas fotoestáveis e que a mangiferina e naringenina não tiveram influência na fotoestabilidade das mesmas. Os resultados desse estudo sugerem que o DHHB, em função de sua elevada fotoestabilidade, também proporcionou essa característica às formulações que o continha, inclusive para as formulações contendo a associação 3, que apresentava em sua composição a avobenzona, um filtro solar fotoestável. Dessa forma, a utilização desse filtro solar tanto isoladamente (associação 2) quanto em associação à avobenzona (associação 3) pode ser considerada vantajosa.

Como descrito anteriormente, a radiação UVA apresenta um papel fundamental na indução do câncer de pele, imunossupressão e fotoenvelhecimento, sendo assim, a realização de testes para se determinar o nível de proteção frente a este tipo de radiação é de grande relevância (MARROT et al., 2004; MARROT; MEUNIER, 2008). Nesse sentido, dentre as metodologias preconizadas para o registro de fotoprotetores, encontra-se a pigmentação persistente *in vivo* (PPD), que avalia a resposta da pigmentação da pele após a exposição à radiação UVA (LIM; DRAELOS, 2009; VELASCO et al., 2011). Além disso, durante o processo de triagem de formulações fotoprotetoras, podem ser utilizados métodos *in vitro*, como a determinação do comprimento de onda crítico e a razão UVA/UVB, ou *Boot's Star Rating*, os quais são medidas relativas do espectro de absorção do fotoprotetor. Nesse último, os resultados são apresentados com estrelas, de forma que, quanto maior o número de estrelas maior é a proteção UVA estimada (VELASCO et al., 2011).

A razão UVA/UVB é amplamente utilizada para a determinação da fotoestabilidade, uma vez que é considerado um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo (CHATELAIN; GABARD, 2001), e, portanto, foi determinada no presente estudo.

Desta forma, quando os valores da razão UVA/UVB das formulações submetidas ou não à irradiação, contendo avobenzona (associação 1) foram comparados com seus correspondentes que apresentavam DHHB (associação 2) foi observado que não houve diferença estatística significativa quanto à razão UVA/UVB. No entanto, quando os valores da razão UVA/UVB das formulações contendo a combinação de avobenzona e DHHB (associação 3) foram comparadas às formulações contendo avobenzona e DHHB, separadamente (associações 1 e 2, respectivamente) foi observado um aumento pronunciado da razão UVA/UVB.

Portanto, pode-se sugerir que a associação da avobenzona e do DHHB (associação 3) proporcionou uma combinação sinérgica, a qual resultou em uma razão UVA/UVB elevada (superior a 1,5), o que pode ser justificado pelo fato de ambos os filtros apresentarem amplo espectro de proteção contra a radiação UVA. Já as formulações que continham esses filtros isoladamente, associações 1 e 2, respectivamente, mantiveram a razão UVA/UVB superior a 1,00.

Sendo assim, de acordo com o *Boot's Star Rating System*, (BOOTS THE CHEMISTS, 2004) todas as formulações em estudo apresentaram ultra proteção UVA (cinco estrelas) mesmo após irradiação, uma vez que mantiveram a razão UVA/UVB superior a 0,90. Entretanto, considerando os efeitos nocivos da radiação UVA e a crescente incidência da radiação UV na superfície da Terra, o desenvolvimento de fotoprotetores com maior performance na região do UVA torna-se relevante para a obtenção de uma proteção adequada.

Além dos estudos de fotoestabilidade, outros dados referentes à segurança dos produtos cosméticos, como irritação, sensibilização, toxicidade e carcinogenicidade, deverão ser obtidos. Entretanto, no caso de fotoprotetores, estes estudos também devem ser realizados com a exposição à radiação UV, a fim de se avaliar irritação, sensibilização, toxicidade e carcinogenicidade fotoinduzidas. Nesse sentido, o estudo de fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT) apresenta grande relevância, sendo considerado o principal teste para a predição do potencial fototóxico de uma substância ou associação (HAYDEN et al., 2003; LIEBSCH et al., 2005).

Em relação aos estudos de fotototoxicidade foi observado que a avobenzona, quando utilizada isoladamente, apresentou potencial fototóxico. Esse resultado está de acordo com os dados da literatura (BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015; GASPAR et al., 2013; HAIDEN et al., 2005) e associado ao fato dessa molécula ter

apresentado fotoinstabilidade, sendo os produtos de fotodegradação formados, os prováveis responsáveis por seu potencial fototóxico (KARLSSON et al., 2009).

No entanto, a associação contendo avobenzona, metoxicinamato de etilexila e octocrileno (A1) não apresentou potencial fototóxico o que pode ter ocorrido pela presença do octocrileno, um filtro solar que estabiliza a avobenzona, atuando como um *quencher* do estado excitado tripleto (SHAATH, 2010). Consequentemente, esse fotoestabilizador impede/reduz a ocorrência de fotorreações, as quais são responsáveis pela formação de subprodutos altamente reativos da avobenzona (SHAATH 2010; KOCKLER et al., 2012).

O DHHB apresentou potencial fototóxico quando analisado isoladamente. No entanto, as associações 2 (contendo metoxicinamato de etilexila, octocrileno e DHHB) e 3 (contendo metoxicinamato de etilexila, octocrileno, DHHB e avobenzona) não apresentaram potencial fototóxico. Dessa forma, o seu uso em associação a outros filtros solares pode ser considerado seguro, uma vez que se uma substância não apresentar potencial fototóxico agudo na cultura de fibroblastos, seguramente não apresentará fototoxicidade *in vivo* (KEJLOVÁ et al., 2007).

A associação do DHHB à naringenina (A2N) também não apresentou potencial fototóxico, entretanto, quando a avobenzona foi associada à naringenina (A1N), essa associação passou a apresentar potencial fototóxico (A1N: 0,105; 0,213; 0,162). A associação do DHHB à avobenzona / naringenina (A3N) não alterou o potencial fototóxico dessa associação (A3N: 0,199; 0,191). Dessa forma, o uso das associações A1N e A3N não seria vantajoso para formulações fotoprotetoras.

O potencial fototóxico apresentado pela associação A1N pode estar relacionado com o fato dessa mesma associação, quando presente na formulação (FB1N) ter apresentado fotodegradação, tanto no estudo de fotoestabilidade por CLAE quanto por espectrofotometria no UV. Essa provável fotodegradação pode ter levado à formação de produtos tóxicos aos fibroblastos expostos à radiação.

Já a formulação FB3N foi considerada fotoestável quanto ao teor de naringenina, porém fotoinstável quanto ao teor de avobenzona. Dessa forma, apesar de o DHHB presente na formulação FB3N ter promovido uma melhora da fotoestabilidade da naringenina, sugere-se que o mesmo não foi capaz de impedir a formação de radicais livres e fotoprodutos, provavelmente gerados pela fotodegradação da avobenzona, que levaram a um aumento de seu potencial fototóxico.

Considerando os resultados obtidos, é possível sugerir que um estabilizador pode melhorar a fotoestabilidade de alguns componentes de formulações fotoprotetoras sem necessariamente reduzir a fototoxicidade produzida por subprodutos tóxicos, uma vez que alguns produtos de degradação e EROs, possivelmente formados durante a exposição à radiação UV, não podem ser quantificadas por técnicas tradicionais como CLAE.

Embora as associações FB1N e FB3N tenham sido consideradas potencialmente fototóxicas, quando estas foram acrescidas de mangiferina (FB1MN e FB3MN, respectivamente) passaram a ser classificadas como não fototóxicas, o que indica que a mangiferina, possivelmente, reduziu o potencial fototóxico dessas associações. Dentre os diversos mecanismos envolvidos nesse processo, sugere-se que a elevada atividade antioxidante da mangiferina, uma vez que atua por meio do sequestro do oxigênio singlete e outras EROs formadas após a fotodegradação dos filtros solares, impedindo que provoquem danos na pele (JAGETIA; VENKATESHA, 2005; MASIBO; HE, 2008).

Apesar das associações contendo avobenzona e naringenina (FB1N e FB3N) terem apresentado potencial fototóxico no presente estudo, não necessariamente irão apresentar fototoxicidade *in vivo*, visto que esse potencial está relacionado não somente ao potencial fototóxico, mas também à habilidade de uma substância em penetrar na pele. Portanto, a penetração cutânea é um parâmetro extremamente importante, que deve ser levado em consideração para a predição do potencial fototóxico de uma substância ou associação (KEJLOVÁ et al., 2007; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015).

Nesse contexto, uma das limitações do teste 3T3 NRU PT é o fato da cultura de fibroblastos em monocamadas não apresentar a camada córnea, a qual apresenta um importante papel na função de barreira da pele, acarretando a esse teste a presença de resultados falsos-positivos (CERIDONO et al., 2012). Desta forma, a OECD preconiza a realização de outros testes complementares ao teste 3T3 NRU PT para a determinação do potencial fototóxico de uma substância, por meio da definição de estratégias, dentre as quais envolvem o estudo de fototoxicidade em modelo de pele humana reconstituída, seguida pelo estudo em humanos (LIEBSCH et al., 2005; JONES et al., 2003).

O modelo de pele humana reconstituída apresenta camada córnea e metabolismo muito semelhante à pele humana *in vivo*, e, portanto, é indicado como

o teste subsequente a ser realizado quando uma substância apresenta potencial fototóxico no teste 3T3 NRU PT (KEJLOVÁ et al., 2007; CERIDONO et al., 2012; LIEBSCH et al., 2005).

Atualmente, no Brasil, ainda não é possível utilizar o modelo de pele humana reconstituída para a predição do potencial fototóxico de uma substância ou associação, dessa forma, sugere-se que sejam realizados outros estudos que levem em consideração a penetração cutânea, como, por exemplo, o estudo de penetração cutânea *in vitro* em célula de Franz, utilizando pele de orelha de porco como modelo experimental (FREITAS et al., 2015).

Dentre as estratégias preconizadas pela OECD para a determinação do potencial fototóxico, o estudo clínico (*photopatch*) constitui a última etapa. No entanto, esse estudo deverá ser conduzido somente após a confirmação da ausência de potencial fototóxico *in vitro*, em modelo de pele humana reconstituída, e em conformidade com os princípios éticos, evitando, desta forma, que sejam oferecidos riscos para os voluntários (GASPAR et al., 2013; KEJLOVÁ et al., 2007; LIEBSCH et al., 2005).

Kejlová e colaboradores (2007) confirmaram que o óleo de bergamota, classificado como fototóxico pelo teste 3T3 NRU PT, também apresentou fototoxicidade em modelo de pele humana reconstituída (KEJLOVÁ et al., 2007). Entretanto, o mesmo não foi obtido quando uma associação contendo avobenzona e palmitato de retinila foi avaliada, pois apesar de classificada como potencialmente fototóxica pelo teste 3T3 NRU PT, quando o estudo foi realizado em modelo de pele reconstituída as associações não apresentaram potencial fototóxico (GASPAR et al., 2013).

Estes resultados podem ser justificados pelo fato da avobenzona apresentar baixa biodisponibilidade na pele, a qual é um fator chave para o desenvolvimento de reações cutâneas, após irradiação (KEJLOVÁ et al., 2007).

Haiden e colaboradores (2005) também demonstraram que, embora a avobenzona tenha apresentado uma alta toxicidade em cultura de queratinócitos humanos, ela não apresenta penetração cutânea e, portanto, a concentração desse filtro detectada na epiderme viável após aplicação tópica foi pelo menos cinco vezes menor do que a concentração tóxica em queratinócitos.

Dessa forma, as formulações contendo a combinação de avobenzona e naringenina (FB1N e FB3N), consideradas como potencialmente fototóxicas,

deverão ser submetidas a testes adicionais que levem em consideração a penetração cutânea, para se assegurar a real fototoxicidade das mesmas.

Os resultados encontrados no presente estudo são promissores uma vez que foi demonstrado o potencial da mangiferina em aumentar a fotoestabilidade e reduzir o potencial fototóxico da naringenina e da avobenzona. Ainda em relação à fototoxicidade, a mangiferina também reduziu o potencial fototóxico da associação naringenina / avobenzona / DHHB.

Por outro lado, a combinação naringenina / avobenzona, a princípio, não é recomendada para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras, uma vez que tanto a naringenina quanto a avobenzona apresentaram maior fotodegradação e potencial fototóxico quando associadas (formulação FB1N e associação A1N, respectivamente).

Além disso, apesar do DHHB não ter promovido melhora significativa da fotoestabilidade da avobenzona, quando associado a ela (associação 3), a associação desses dois filtros resultou em uma proteção UVA superior do que quando utilizados isoladamente.

Desta forma, levando em consideração que um produto cosmético não deve oferecer risco para a saúde do consumidor, deve-se evitar a utilização da naringenina em formulações fotoprotetoras, já que a mesma apresentou fotodegradação. Além disso, alguns estudos mostram que essa substância, em determinadas condições, pode apresentar atividade pró-oxidante. Sendo assim, dentre os dois polifenóis avaliados no presente estudo, sugere-se que a utilização da mangiferina pode ser considerada mais segura. Entretanto, para avaliar os reais benefícios da associação dessa substância a filtros solares, deverão ser realizados estudos de eficácia, tais como atividade antioxidante na pele e efeitos antienvelhecimento e fotoprotetor.

6. Conclusões

- As formulações elaboradas com a base autoemulsificante B foram as mais estáveis nos testes preliminares de estabilidade, uma vez que não houve separação de fase após o teste de centrifugação, sendo, portanto, selecionadas para os testes de fotoestabilidade.
- O método de CLAE se apresentou adequado para a quantificação simultânea das substâncias em estudo, obtendo resultados de padronização dentro das normas preconizadas.
- No estudo de fotoestabilidade por CLAE as substâncias mangiferina, DHHB e octocrileno foram consideradas fotoestáveis, entretanto a naringenina e avobenzona foram consideradas fotoinstáveis. Além disso, foi demonstrado que a adição de mangiferina à associação contendo avobenzona e naringenina (FB1MN), proporcionou um aumento da fotoestabilidade das mesmas.
- A presença do DHHB na formulação FB3N (contendo avobenzona DHHB e naringenina) promoveu melhora da fotoestabilidade da naringenina, no entanto não houve melhora da fotoestabilidade da avobenzona.
- As análises espectrofotométricas demonstraram que todas as formulações foram consideradas fotoestáveis, exceto as formulações contendo a associação 1 de filtros solares (FB1, FB1M e FB1N). As formulações contendo a associação de avobenzona e DHHB (associação 3) apresentaram uma proteção no UVA superior às demais associações, ou seja, que continham avobenzona e DHHB isoladamente.
- O estudo de fototoxicidade mostrou que a avobenzona e o DHHB apresentaram potencial fototóxico. Quando as associações de filtros solares e antioxidantes foram analisadas, foi observado que a associação de avobenzona e naringenina, combinada ou não ao DHHB (A3N e A1N, respectivamente), apresentou potencial fototóxico. Dessa forma, esta não é recomendada para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras
- A associação DHHB / avobenzona, por apresentar elevada proteção UVA, pode ser vantajosa para o desenvolvimento de fotoprotetores. Entretanto a sua associação com antioxidantes deve ser utilizada com cautela e analisada caso a caso. A naringenina não é indicada para fotoprotetores contendo avobenzona, uma vez esta associação foi considerada fotoinstável e

fototóxica. Já a utilização da mangiferina pode ser considerada mais segura, e, além disso, a sua elevada atividade antioxidante pode complementar a eficácia de fotoprotetores.

7. Referências

ADHAMI, V.M.; SYED, D.N.; KHAN, N.; AFAQ, F. Phytochemical for prevention of solar ultraviolet radiation-induced damages. **Photochem Photobiol.**, v.84, n.2, p.489-500, 2008.

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Arch Biochem Biophys.**, v.508, p.144-151, 2011.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr.**, v.23, p.629-643, 2010.

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

BASF. BASF Sunscreen Simulator. Disponível em: www.basf.com/sunscreen-simulator. Acesso em: 30 abr. 2013.

BENEVENUTO, C.G.; GUERRA, L.O.; GASPAR, L.R. Combination of retinyl palmitate and UV-filters: phototoxic risk assessment based on photostability and *in vitro* and *in vivo* phototoxicity assays. **Eur J Pharm Sci.**, v.68, p.127-136, 2015.

BESERT, G.; GOZENBACH, H.; CHRIST, R.; MARTIN, R.; DEFLANDRE, A.; MASCOTTO, R.E.; JOLLEY, J.D.R.; LOWELL, W.; PELZER, R.; STIEHM, T. Proposed protocol for determination of photostability. Part I: cosmetic UV filters. **Int J Cosmetic Sci.**, v.18, p.167-177, 1996.

BONDA, C.; PAVLOVIC, A.; HANSON, K.; BARDEEN, C. Singlet Quenching Proves Faster is Better for Photostability. **Cosmet Toiletries**, v.125, n.2, p.40-48, 2010.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents photo-oxidative skin damage. **Int J Pharm.**, v.145, n. 1-2, p.87-94, 1996.

BOOTS THE CHEMIST LTD. (England). The revised guidelines to the practical measurement of UVA: UVB ratios according to the boots star rating system. Nottingham: The Boots CO PLC; 2004.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diário Oficial da União, Brasília, 16 de jul. de 2009.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, Brasília, 9 out. de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a

publicação do “Guia para validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” anexo. Diário Oficial da União, Brasília, 2 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, DF: ANVISA, 2004 (Séries Qualidade em Cosméticos, v.1), 2004.

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, 4 de jun. 2012.

BUSHAN, M.; CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; ANDREW, S.M.; KIMBER, I.; GRIFFITHS, C.E. Tumor necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. **Br J Dermatol.**, v. 146, p.32-40, 2002.

CANUTO, K. M.; SOUZA NETO, M. A.; GARRUTI, D. S.; LIMA, M. A. C. Avaliação do uso de inibidores de etileno sobre a produção de compostos voláteis e de mangiferina em manga. **Quím Nova.**, v.33, n.7, p.1535-1540, 2009.

CAVIA-SAZ, M.; BUSTO, M.D.; PILAR-IZQUIERDO, M.C.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; MUNIZ, P. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. **J Sci Food Agric.**, v.90, p.1238-1244, 2010.

CERIDONO, M.; TELLNER, P.; BAUER, D.; BARROSO, J.; ALÉPÉE, N.; CORVI, R.; DE SMEDT, A.; FELLOWS, M.D.; GIBBS, N.K.; HEISLER, E.; JACOBS, A.; JIROVA, D.; JONES, D.; KANDÁROVÁ, H.; KASPER, P.; AKUNDA, J.K.; KRUL, C.; LEARN, D.; LIEBSCH, M.; LYNCH, A.M.; MUSTER, W.; NAKAMURA, K.; NASH, J.F.; PFANNENBECKER, U.; PHILLIPS, G.; ROBLES, C.; ROGIER, V.; VAN DE WATER, F.; LIMINGA, U.W.; VOHR, H.W.; WATTRELOS, O.; WOODS, J.; ZUANG, V.; KREYSA, J.; WILCOX, P. The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity testing- the report of an ECVAM-EFPIA workshop. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.63, n.3, p.480-488, 2012.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzene) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochem Photobiol.**, v.74, n.3, p.401-406, 2001.

CHAUDHURI, R.K.; LASCU, Z.; PUCETTI, G.; DESHPANDE, A.A.; PAKNIKAR, S.K. Design of a photostabilizer having built-in antioxidant functionality and its utility in obtaining broad-spectrum sunscreen formulations. **Photochem Photobiol.**, v.82, n.3, p.823-828, 2006.

CHINEM, V.P.; MIOT, H.A. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **An Bras Dermatol.**, v.86, p.292-305, 2011.

CHTOUROU, Y.; HAMADI, F.; RAOUA, J.; SLIMA, A.B. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway. **Eur J Pharmacol.**, v.746, p.96-105, 2015.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M.; GOLDSMITH, L.A.; MACHER, E.; MADERSON, P.A.; SUNDBERG, J.P.; TAGAMI, H, et al. What is the "true" function of skin? **Exp Dermatol.**, v.11, p.159-182, 2002.

COLLINS, D.; KOPIC S.; GEIBEL J.P.; HOGAN A.M.; MEDANI M.; BAIRD A.W.; WINTER D.C. The flavonone naringenin inhibits chloride secretion in isolated colonic epithelia. **Eur J Pharmacol.**, v.668, n.1-2, p.271-277, 2011.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Decisão da Comissão, de 9 de Fevereiro de 2006 , que altera a Decisão 96/335/CE que estabelece um inventário e uma nomenclatura comum dos ingredientes utilizados nos produtos cosméticos. L 97, Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, 05 de abril de 2006.

DAI, R.; LI, K.; LI, Q.; BI, K. Determination of mangiferin, jateorrhizine, berberine, cinnamic acid, and cinnamaldehyde in the traditional chinese medicinal preparation Zi-shen pill by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr Sci.**, v.42, n.4, p.207-210, 2004.

DAMIANI, E.; BASCHONG, W.; GRECI, L. UV-filter combination under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity. **J Photochem Photobiol.**, v.87, p.95-104, 2007.

DAMIANI, E.; CARLONI, P.; BIONODI, C.; GRECI, L. Increased oxidative modification of albumin when illuminated in-vitro in the presence of a common sunscreen ingredient: protection by nitroxide radicals. **Free Radic Biol Med.**, v.28, p.193-201, 2000.

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. **J Photochem Photobiol.**, v.82, n.3, p.204-213, 2006.

DAS, J.; GHOSH, J.; ROY, A.; SIL, P.C. Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2-NF κ B pathways. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.260, n.1, p.35-47, 2012.

DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. Beyond UV radiation: a skin under challenge. **Int J Cosmetic Sci.**, v.35, p.224-232, 2013.

EDWARDS, C.; MARKS, R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. **Clin Dermatol.**, v.13, p.375-380, 1995.

EL-MAHDY, M.A.; ZHU, Q.; WANG, Q.; WANI, G.; PATNAIK, S.; ZHAO, Q.; ARAFA, E.; BARAKAT, B.; MIR, S.N.; WANI, A.A. Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the

removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. **Photochem Photobiol.**, v.84, n.2, p.307-316, 2008.

ESPARZA, M.R.C.; GÓMEZ, M.V.S.; MATUTE, C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium**, v.45, n.4, p.358-368, 2009.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.19, n.2, p.56-72, 2003.

FOURTANIER, A.; BERNERD, F.; BOUILLON, C.; MARROT, L.; MOYAL, D.; SEITÉ, S. Protection of skin biological targets by different types of sunscreens. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.22, n.1, p.22-32, 2006.

FREITAS, J.V.; PRAÇA, F.S.G.; BENTLEY, M.V.L.B.; GASPAR, L.R. *Trans*-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **Int J Pharm.**, v.484, p.131-137, 2015.

FREITAS, J.V.; SÁ, L.L.; GASPAR, L.R. Influence of the UV-filters bemotrizinole and octyltriazone in photostability of sunscreens containing *trans*-resveratrol and beta-carotene. In: 22^o IFSCC, Rio de Janeiro, 2013.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicol.**, v.177, p.91-104, 2002.

GAROLI, D.; PELIZZO, M.G.; BERNARDINI, B.; NICOLOSI, P.; ALAIBAC, M. Sunscreen tests: correspondence between in vitro data and values reported by the manufactures. **J Dermatol Sci.**, v.52, p.193-204, 2008.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of different UV filters associations in a sunscreen. **Int J Pharm.**, 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. **Int J Pharm.**, v.343, n.1-2, p.181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int J Pharm.**, v.250, n.1, 2003.

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

GASSER, P.; PENO-MAZZARINO, L.; LATI, E., DJIAN, B. Original semiologic standardized evaluation of stratum corneum hydration by Diagnoskin stripping sample. **Int J Cosmetic Sci.**, v.26, p.117-127, 2004.

GILCHREST, B.A.; ELLER, M.S.; GELLER, A.C.; YAAR, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med.**, v.340, p.1341–1348, 1999.

GOLDSMITH, A. My organ is bigger than your organ. **Arch Dermatol.**, v.126, p.301-302, 1990.

GONZALEZ, S.; LORENTE, M.F.; CALZADA, Y.G. The latest on skin photoprotection. **Clin Dermatol.**, v.26, p.614-626, 2008.

GREWE, M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. **Clin Exp Dermatol.**, v.26, p.608-612, 2001.

HAIDEN, C.G.J.; CROSS, S.E.; ANSERSON, C.; SAUNDERS, N.A.; ROBERTS, M.S. Sunscreen penetration of human skin and related keratinocyte toxicity after topical application. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.18, p.170-174, 2005.

HALLER, P.H. Aplicações de lipídeos e fosfolipídeos em cosméticos. **Cosm Toil.**, v.1, n.4, p.33-40, 1989.

HANSON, K.M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C.J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radic Biol Med.**, v.41, n.8, p.1205-1212, 2006.

HAYDEN, P.J.; AYE HUNIE, S.; JACKSON, G.R.; KUPFER-LAMORE, S.; LAST, T.J.; KLAUSNER, M.; KUBILUS, J. In vitro skin equivalent models for toxicity testing MatTek Corporation, Ashland, MA, U.S.A. Published in Alternative Toxicological Methods. Editors H. Salem, S.A. Katz. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, p.229-247, 2003.

HOLBROOK, K.A.; WOLFF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLF, K. **Dermatology in general medicine**, 4th ed., New York: McGraw-Hill, 1993, cap.16, p.241-253.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2014.

IOBST, S.; SANTHANAM, U.; WEINKAUF, R. Biotechnology in skin care (I): Overview. In: LAD, R. **Biotechnology in Personal care**. New York: Taylor and Francis; 2006. Cap. 5, p.117-122.

JaCVAM. Reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals. ROS Assay Protocol, ROS assay Validation Management Team, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, 2013.
http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean.pdf
(acessado em 20.01.2015).

JAGETIA, G.C.; VENKATESHA, V.A. Effect of mangiferin on radiation-induced micronucleus formation in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Environ Mol Mutagen.**, v.46, n.1, p.12-21, 2005.

JANJUA, N.R.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, A.M.; PETERSEN, J.H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, N.E.; WULF, H.C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methylbenzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **J Invest Dermatol.**, v.123, n.1, p.57-61, 2004.

JEAN, C.; BOGDANOWICZ, P.; HAURE, M.J.; CASTEX-RIZZI, FOURNIE, J.J. UVA activated synthesis of metalloproteinases 1, 3 and 9 is prevented by a broad spectrum sunscreen. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.27, p.318-324, 2011.

JIROVÁ, D.; LIEBSCH, M.; BASKETTER, D.; SPILLER, E.; KEJLOVA, K.; BENDOVA, H.; MARRIOTT, M.; KANDAROVA, H. Comparison of human skin irritation and phot-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data. **AATEX**, n.14, p.359-365, 2008.

JONES, P.A.; KING, A.V.; EARL, L.K.; LAWRENCE, R.S. An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using *in vitro* assays. **Toxicol in Vitro.**, v.17, p.471-480, 2003.

KANAZE, F.I.; KOKKALOU, E.; GEORGARAKIS, M.; NIOPAS, I. Validated high- performance chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperidin in human plasma. **J Chromatogr B.**, v.801, n.2, p.363-367, 2004.

KARLSSON, I.; HILLERSTROM, L.; STENFELDT, A.L.; MARTENSSON, J.; BORJE, A. Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens. **Chem Res Toxicol.**, v.22, n.11, p.1881-1892, 2009.

KAWAKAMI, C.M.; FONTANEZI, B.B.; PEREIRA, K.C.; GASPAR, L.R. Avaliação do potencial fotoprotetor dos polifenóis mangiferina, morina e naringenina. In: XXI COLAMIQ, São Paulo, 2013.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDOVÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁROVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicol in Vitro.**, v.21, n.7, p.1298-1303, 2007.

KIKUCHI, A.; HATA, Y.; KUMASAKA, R.; NANBU, Y.; YAGI, M. Photoexcited Singlet and Triplet States of a UV Absorber Ethylhexyl Methoxycrylene. **Photochem Photobiol.**, v.89, p.523-528, 2013.

KIM, H.S.; SONG, J.H.; YOUN, U.J.; HYUN, J.W.; JEONG, W.S.; LEE, M.Y.; CHOI, H.J.; LEE, H.K.; CHAE, S. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferina isolated from *Anemarrhena asphodeloide*. **Eur J Pharmacol.**, v. 689, p.38-44, 2012.

KIM, K.; MUELLER, J.; PARK, Y.B.; JUNG, H.R.; KANG, S.H.; YOON, M.H.; LEE, J.B. Simultaneous determination of nine UV filters and four preservatives in suncare products by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr Sci.**, v.49, n.7, p.554-559, 2011.

KOCKLER, J.; OELGEMOLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B.D. Photostability of sunscreens. **J Photoch Photobio C.**, v.13, n.1, p.91-110, 2012.

LHIAUBET-VALLET, V.; MARIN, M.; JIMENEZ, O.; GORCHS, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.A. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochem Photobiol Sci.**, v.9, p.552-558, 2010.

LI, T.R.; Yang, Z.Y.; Wang, B.D.; Qin, D.D. Synthesis, characterization, antioxidant activity and DNA-binding studies of two rare earth (III) complexes with naringenin-2-hydroxy benzoyl hydrazone ligand. **Eur J Med Chem.**, v.43, n.8, p.1688-1695, 2008.

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. **Altern Lab Anim.**, v.33, p.131-146, 2005.

LIM, H.W.; DRAELOS, Z.D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection**. Informa Healthcare USA, Inc. New York. 322 p., 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact in human health. **Pharmacogn Rev.**, v.4, n.8, p.118-126, 2010.

MANOVÁ, E.; VON GOETZ, H.; HUNGERBUHLER, K. Ultraviolet filter contact and photocontact allergy: consumer exposure and risk assessment for octocrylene from personal care products and sunscreens. **Br J Dermatol.**, v.171, n.6, p.1368-1374, 2014.

MARROT, L.; BELAÏDI, 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. **Br J Dermatol.**, v.151, n.6, p.1234-1244, 2004.

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J Am Acad Dermatol.**, v.58, p.139-148. 2008.

MASIBO, M.; HE, QIAN. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. **Compr Rev Food Sci F.**, v.7, p.309-319, 2008.

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

MIR, I.A.; TIKU, A.B. Chemopreventive and therapeutic potential of "naringenin", a flavonone present in citrus fruits. **Nutr Cancer**, v.67, n.1, p.27-42, 2015.

MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M.L.; BUHLER, D.R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. **J Agric Food Chem.**, v.48, p.3876-3884, 2000.

MITCHELL, J.R.; HOEIJMAKERS, J.H.; NIEDERNHOFER, L.J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Curr Opin Cell Biol.**, v.15, p.232-240, 2003.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; JOSHUA, L.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Internat J Dermatol.**, v. 49, p.978-986, 2010.

NASH, J.F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen Products. **Dermatol Clin.**, v.24, n.1, p.35-51, 2006.

NASH, J.F.; TANNER, P.R. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.30, p.88-95, 2014.

NICHOLS, J.A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms. **Arch Dermatol Res.**, v.302, n.2, p.1-19, 2010.

NYEBORG, M.; PISSAVINI, M.; LEMASSON, Y.; DOUCET, O. Validation of HPLC method for the simultaneous and quantitative determination of 12 UV-filters in cosmetics. **Int J Cosmetic Sci.**, v.32, n.1, p.47-53, 2010.

OECD, 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004) <<http://www.oecd.org/>>.

OHKATSU, Y.; SAKURAI, T.; SATO, T. Relationship between chemical structure and antioxidant function of flavonoids. **J Jpn Petrol Inst.**, v.53, n.4, p.213-221, 2010.

ONOUÉ, S.; IGARASHI, N.; YAMADA, S.; TSUDA, Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: an enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. **J Pharmaceut Biomed.**, v.46, p.187-193, 2008.

PAL, B.P.; SINHA, K.; SIL, P.C. Mangiferin, a natural xanthone, protects murine liver in Pb(II) induced hepatic damage and cell death via MAP kinase, NF- κ B and mitochondria dependent pathways. **PLoS ONE**, v.8, n.2, 2013.

PARIS, C.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, O.; TRULLAS, C.; MIRANDA, M.A. A blocked diketo form of avobenzone: photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter. **Photochem Photobiol.**, v.85, n.1, p.178-184, 2009.

PATEL, K.; SINGH, G.K.; PATEL, D.K. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. **Chin J Integr Med.**, 2014.

PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAN, P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. **J Photochem Photobiol.**, v.161, p.269-274, 2004.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; BERTINI, B.; RICCI, M.; NOCCHETTI, M.; LATTERINI, L.; ROSSI, C. Anionic clays for sunscreen agent safe use: photoprotection, photostability and prevention of their skin penetration. **Eur J Pharm Biopharm.**, v.62, p.185-193, 2006.

PETROVA, A.; DAVIDS, L.M.; RAUTENBACH, F.; MARNEWICK, J.L. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB-induced skin damage in SKH-1 mice. **J Photochem Photobiol B.**, v.103, n.2, p.126-139, 2011.

PINNELL, S.R.; DURHAM, M.D. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J Am Acad Dermatol.**, v.48, p.1-19, 2003.

PREMI, S.; WALLISCH, S.; MANO, C.M.; WEINER, A.B.; BACCHIOCCHI, A.; WAKAMATSU, K.; BECHARA, E.J.H.; HALABAN, R.; DOUKI, T.; BRASH, D.E. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, v.347, n.6224, p.842-847, 2015.

PRESTON, D.S.; STERN, R.S. Non melanoma cancers of the skin. **N Engl J Med.**, v.327, p.1649-1662, 1992.

PROCHÁKOVÁ, D., BOUSOVÁ, I., WILLHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.82, p.513-523, 2011.

PUGLIA, C.; DAMIANI, E.; OFFERTA, A.; RIZZA, L.; TIRENDI, G.G.; TARICO, M.S.; CURRERI, S.; BONINA, F.; PERROTTA, R.E. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, in vitro penetration and photostability studies. **Eur J Pharm Sci.**, v.51, p.211-217, 2014.

RAZA, S.S.; KHAN, M.M.; AHMAD, A.; ASHAFAQ, M.; ISLAN, F.; WAGNER, A.P.; SAFHI, M.M.; ISLAN, F. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- κ B signaling pathway in experimental stroke. **Neurosci.**, v.230, p.157-171, 2013.

RODEIRO, I.; HERNANDEZ, S.; MORFFI, J.; HERRERA, J.A.; GOMEZ-LECHON, M.J.; DELGADO, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. Evaluation of genotoxicity and DNA protective effects of mangiferin, a glucosylxanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark extract. **Food Chem Toxicol.**, v.50, p.3360-3366, 2012.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Rev Cosm Med Estet.**, v.5, n.2, p.26-35, 1997.

ROELANDTS, R. Shedding light on sunscreens. **Clin Exp Dermatol.**, v.23, n.4, p.147-157, 1998.

SAHU, S.C.; GRAY, G.C. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. **Food Chem Toxicol.**, v.35, p.443-447, 1997.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. **Int J Pharm.**, v.175, p.85-94, 1998.

SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **J Am Acad Dermatol.**, v.64, n.4, p.748-758, 2011.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane- octyl methoxycinnamate. **Photochem Photobiol.**, v.86, p.273-278, 2010.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters Part 1. **J Photochem Photobiol.**, v.28, n.3, p.229-234, 1995.

SHAATH, N.A. **The Encyclopedia of Ultraviolet Filters**, Carol Stream, IL USA: Allured p.19, 2007.

SHAATH, N.A. Ultraviolet filters. **Photochem Photobiol Sci.**, v.9, p.464-469, 2010.

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. **Photochem Photobiol Sci.**, v.12, p.54-64, 2013.

SOBANSKA, A.N.; BRZEZINSKA, E. Simultaneous NP TLC analysis of the sunscreens diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate and octyl methoxycinnamate. **J Planar Chromatogr.**, v.24, n.3, p.227-231, 2011.

SONG, J.H.; BAE, E.Y.; CHOI, G.; HYUN, J.W.; LEE, M.Y.; LEE, H.W.; CHAE, S. Protective effect of mango (*Mangifera indica* L.) against UVB-induced skin aging in hairless mice. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v.29, p.84-89, 2013.

SOUZA, J.R.R.; FEITOSA, J.P.A.; RICARDO, N.M.P.S.; TREVISAN, M.T.S.T.; DE PAULA, H.C.B.P.; ULRICH, C.M.; OWEN, R.W. Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. **Food Hydrocolloids.**, v.33, n.1, p.10-18, 2013.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.69, p.71-77, 2014.

STOKES, R.; DIFFEY, B. *In vitro* assessment of sunscreen photostability: the effect of radiation source, sunscreen application thickness and substrate. **Int J Cosmetic Sci.**, v.21, n.5, p.341-351, 1999.

TOLLESON, W.H.; CHERNG, S.H.; XIA, Q.; BOUDREAU, M.; YIN, J.J.;

WAMER, W.G.; HOWARD, P.C.; YU, H.; FU, P.P. Photodecomposition and phototoxicity of natural retinoids. **Int J Environ Res Public Health.**, v.2, n.1, p.147-155, 2005.

TUCHINDA, C.; LIM, H.W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel emerging sunscreen technologies. **Dermatol Clin.**, v.24, p.105–117, 2006.

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

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALLI, 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. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.32, n.1, p.27-34, 2011.

VELASCO, M.V.R.; SARRUF, F.D.; SANTOS, I.M.N.S.; FILHO, C.A.H.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **Int J Pharm.**, v.363, p.50-57, 2008.

VENDITTI, E.; BRUGÈ, F.; ASTOLFI, P.; KOCHEVAR, I.; DAMIANI, E. Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblast against oxidative damage. **J Dermatol Sci.**, v. 63, p.55-61, 2011.

VERSCHOOTEN, L.; CLAERHOUTS, S.; LAETHEM, A.V.; AGOSTINIS, P.; GARMYN, M. New strategies of photoprotection. **Photochem Photobiol.**, v.82, p.1016-1023, 2006.

VINARDEL, M.P. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on consumer safety (SCCS). **Regul Toxicol Pharm.**, v.71, p.198-204, 2015.

VIoux-CHAGNOLEAU, C.; LEJEUNE, F.; SOK, J. Reconstructed human skin: from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **J Dermatol Sci.**, v.2, S1-S12, 2006.

WANG, S.Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatol Ther.**, v.23, p.31-47, 2010.

WEBER, S. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of a recent biophysical studies on photolyase. **Biochim Biophys Acta**, v.1707, p.1-23, 2005.

WHARTON, M., GEARY, M., O'CONNOR, N., MURPHY, B. A rapid high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of seven UV filters found in sunscreen and cosmetics. **Int J of Cosmetic Sci.**, v.33, p.164-170, 2011.

WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Identification of quenchers of photoexcited states as novel agents for skin photoprotection. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.312, n.2, 2005.

WU, Y.; MATSUI, M.S.; CHEN, J. Z. S.; JIN, X.; SHU, C.M.; JIN. G.Y.; DONG, G.H.; WANG, Y.K., GAO, X.H.; CHEN, H.D.; LI, Y.H. Antioxidants add protection to a broad- spectrum sunscreen. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.36, p.178-187, 2011.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; TSAI, H.L.; HUANG, S.L. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v.67, n.6, p.1215–1222, 2003.

ZHANG, B.; FANG, J.; CHEN, Y. Antioxidant effect of mangiferin and its potential to be a cancer chemoprevention agent. **Lett Drug Des Discov.**, v.10, n.3, p.239-244, 2013.