

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um novo método *in vitro* para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon* A.)

Dayane Cristina de Moraes

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de um novo método *in vitro* para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon* A.)

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Dayane Cristina de Moraes

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado ou Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 06/03/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

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.

Moraes, Dayane Cristina

Desenvolvimento de um novo método in vitro para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon* A.). Ribeirão Preto, 2018.

118 p.; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

1. Protetores solares.
2. Métodos in vitro.
3. Fator de proteção solar.
4. Metodologia de superfície de resposta.
5. Fotoquimioproteção.
6. *cranberry*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dayane Cristina de Moraes

Desenvolvimento de um novo método in vitro para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.).

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à minha mãe Azenir de
Moraes.*

Agradecimentos

Dizer “muito obrigada” jamais será suficiente para expressar toda a gratidão que sinto ao olhar para trás e reviver cada passo de minha trajetória. Nessa retrospectiva, encontro gravado na memória os rostos de pessoas que cruzaram meu caminho, sempre movimentado, num ir e vir infinito. Algumas caminharam rápido demais, mais do que meus pés alcançavam; outras viajavam pela estrada sem pressa. Com elas, aprendi muito e sou grata. Mas há aquelas que me permitiram acompanhar seus passos, que me apoiaram em seus ombros quando eu estava cansada, que calçaram meus sapatos. A essas pessoas, espero ter a chance de retribuir toda generosidade, empatia e apoio a mim oferecido.

Dito isso, não posso deixar de agradecer, antes de tudo, ao Universo que diante de tantas possibilidades e probabilidades, me posicionou em uma condição de privilégio, estabelecendo as conexões necessárias para que eu viesse a ser quem sou e encontrar-me justamente aonde eu deveria estar. Que me deu exatamente aquilo que eu precisava, nem mais, nem menos.

Agradeço imensamente à minha orientadora, prof. Dra. Maria José Vieira Fonseca, pelo apoio inestimável nos momentos mais difíceis, pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos valiosos, pelo tempo dedicado a mim durante esses anos de doutorado.

Às colegas de laboratório, que batalharam juntas pelo mesmo sonho: Ana Luiza, Michelle, Geórgia, Karini, Rebeca e Sonia.

À Sônia Ap. Figueiredo e Michelle de Andrade, parceria, pelas injeções de ânimo, pelos conselhos, enfim, pela amizade de vocês, que foi imprescindível para que eu chegasse até aqui.

Ao Jabor (Sr. José Roberto), pela ajuda indispensável para realização de experimentos, dedicação, incentivo e amizade.

Aos técnicos da FCFRP-USP: Angélica, Aurea, Aninha, Cris, Eduardo, Emerson, Luizão, Mário, Zé Maria e Henrique, pela assistência e contribuição ao meu trabalho.

Ao prof. Dr. Luis Alexandre Freitas, pela imensa contribuição ao segundo capítulo deste trabalho, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores da FCFRP-USP: Dr. Augusto César Cropanese Spadaro; Dra Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos; Dr. Sérgio Akira; Dra Yara Maria Lucisano Valim, Dra. Renata Fonseca Vianna Lopes e Dra. Maria Vitória Bentley por disponibilizarem, gentilmente, os equipamentos em seus laboratórios e, até mesmo, alguns reagentes, todos essenciais para realização deste trabalho.

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

Ao Serviço de Promoção Social da USP/RP, sobretudo à Márcia, Cláudia e Fabiana, pelo excelente serviço prestado.

Aos funcionários da USP/RP, em especial aos lotados na FCFRP, que exercem trabalhos de uma importância inestimável: controladores de acesso, copeiras, faxineiras, vigias, motoristas do circular, pessoal que trabalha no restaurante universitário, bibliotecários.

Aos amigos Margarete, Pryscila, Amanda, Marília, Fran, Dani, Hugo, Herbert, Federico, Robson, Luanny, Breno, Aniele (incluo aqui Lucas e Caroline), Zé e claro, às 10: Lu, Camila, Dani, Diani, Fer, Aline, Leizi, Thaysa e Lori! Sem vocês, tudo seria mais difícil.

Aos amigos que “marcaram época” na casa 13: Pry, Bel, Marco, Daniel, Tati, Maurício, Odival, Fernandinha, Simone, Diógenes, Alexandre, Fabian e Federico.

Ao Sr. Luis Carlos, D. Gilsa, Letícia e Melissa por terem me acolhido carinhosamente e terem feito eu me sentir em casa mesmo estando a 900 km de distância.

Ao prof. Dr. Daniel de Paula, pela confiança, incentivo, pelo aprendizado e amizade.

À psicóloga Juliana Bissoli, que além de ser uma pessoa maravilhosa, é uma profissional incrível, que me ajudou a encontrar sustentação e força interior, sempre acendendo uma luz na escuridão.

À Dra. Maria Luiza Zamboni Grecco, pelo profissionalismo, atenção, paciência e conselhos valiosos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Aos meus alunos, por tornarem meus dias mais alegres!

Agradeço, acima de tudo, aos meus irmãos: Daylane, Daniele, Denize, Jeferson, Paulo e Claudete, pessoas extraordinárias com as quais tive o privilégio de dividir minha história de vida. Obrigada por existirem.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.”*

Henfil

RESUMO

MORAES, D. C. **Desenvolvimento de um novo método *in vitro* para controle de qualidade de protetores solares e otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.).** 2018. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O objetivo, no capítulo I deste trabalho, foi desenvolver e validar um novo método espectrofotométrico *in vitro* para a avaliação da eficácia de protetores solares, o qual pode ser adotado na rotina industrial como uma maneira de identificar desvios de qualidade e garantir a eficácia de protetores solares a cada novo lote produzido. O método proposto é baseado na absorção espectrofotométrica na região do UV (280-400 nm) de uma camada fina de protetor solar aplicada na face externa de uma cubeta de quartzo preenchida com uma solução padrão (SP) que absorve em toda a região do UV, a fim de obter uma medida de área sob a curva (ASC), empregada como valor de referência para cada FPS testado. Para o desenvolvimento do método, foram utilizados protetores solares da mesma marca, com valores de FPS de 15; 20; 30; 40; 50 e 60, o qual foi aplicado sobre a face externa da cubeta a uma concentração de 0,2 mg/cm². A SP consistiu de uma solução de quercetina (10 µg/mL) à qual foram adicionadas 6 gotas de solução de AlCl₃ 6%. A partir do espectro de absorvância de cada amostra na região de UV foi calculado o valor da ASC. O método demonstrou ser reprodutível, robusto e eficaz para controle de qualidade de protetores solares. Outro importante objetivo desse estudo, descrito no capítulo II, foi determinar as condições ótimas para a extração de compostos fenólicos do *cranberry* em pó utilizando metodologia de superfície de resposta, empregando quatro variáveis independentes: (i) tempo de extração; (ii) proporção planta:solvente; (iii) temperatura e (iv) velocidade de agitação, segundo desenho experimental do tipo Box-Behnken, com análise de três respostas: teor de polifenóis totais (TPT); atividade antioxidante (CI₅₀; DPPH) e teor de sólidos totais (TST). As condições ideais obtidas foram: tempo de extração 5 horas; proporção planta:solvente 1:2; velocidade de agitação 80 RPM e temperatura 45°C, correspondendo aos valores preditos de 433,1 mg/g; 0,100 mg/mL e 19,9% para o TPT; CI₅₀ DPPH e TST, respectivamente. Em seguida, o extrato otimizado de *cranberry* foi avaliado com relação à sua atividade fotoprotetora/fotoquimiotoprotetora. Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o extrato otimizado de *cranberry* apresenta elevado potencial antioxidante ao inibir a quimioluminescência (CI₅₀ de 0,202 ± 0,32 µg/mL) e reduzir a peroxidação lipídica (CI₅₀ de 32,6 ± 5,8 µg/mL). No ensaio de DPPH, obteve-se uma CI₅₀ de 136,7 ± 6,8 µg/mL. Reduziu em 41% a peroxidação lipídica em células L929. Além disso, o extrato incorporado a uma formulação gel-creme, apresentou elevado potencial fotoprotetor *in vitro*.

Palavras-chave: Protetores solares, Métodos *in vitro*, Fator de proteção solar, Metodologia de superfície de resposta, Fotoquimiotoproteção, Cranberry.

ABSTRACT

MORAES, D. C. **New *in vitro* method for quality control of sunscreens and optimization of the extraction process of phenolic antioxidant compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.).** 2018. 118f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The chapter I of this work aims to develop and validate a new *in vitro* spectrophotometric method for assessing the effectiveness of sunscreens, which can be adopted in industrial routine production as a way to identify quality deviations and ensure the effectiveness of sunscreen product. Briefly, the proposed method is based on the spectrophotometric absorption on the UV region (280-400 nm) of a thin layer of sunscreen sample applied on the outside of a quartz cuvette which is filled with a standard solution (SS). The area under the curve of absorption of SS and sunscreen sample is obtained. For the experiment development, it was used sunscreens products of the same brand with SPF values of 15; 20; 30; 40; 50 and 60 which was applied on the cuvette outside at a concentration of 0,2mg/cm². The reference standard used consisted of a quercetin solution added of AlCl₃ 6%. From the absorbance of each sample spectrum in UV region was calculated the value of the area under the curve (AUC). The spectrophotometric method developed was effective for confirm SPF sunscreen products produced batch to batch. In the chapter II, were determined the optimal conditions for phenolic compounds extraction from cranberry powder using the surface response methodology with four independent variables: (i) extraction time (hours); (ii) ratio plant : solvent; (iii) temperature and (iv) speed agitation (RPM) , according to Box-Behnken, with analysis of three answers: total polyphenol content (TPC); antioxidant activity (IC₅₀; DPPH) and total solids content (TSC). The ideal conditions obtained were: extraction time 5 hours; ratio plant:solvent 1:2; agitation speed 80 RPM and temperature 45°C, corresponding to the values predicted of 433.1 mg/g; 0,100 mg/ml and 19.9% for TPC; IC₅₀ DPPH and TSC respectively. Then, the optimized cranberry extract was evaluated with respect to its photoprotective/photochemoprotective activity. Preliminary results presented in this paper demonstrate the ability of optimized cranberry extract to scavenge free radicals, with a high antioxidant potential to inhibit satisfactorily chemiluminescence generated in the system xanthine/XOD/luminol; presenting IC₅₀ 0.202 ± 0.32 µg/ml; lipid peroxidation using yolk egg as lipid substrate, with an IC₅₀ of 32.6 ± 5,8 µg/ml. In DPPH test, the optimized extract showed an IC₅₀ of 136.7 ± 6.8 mg/mL. The extract was also able to reducing UVB radiation-induced damage at the cellular level in fibroblasts mice of L929 line, with a 41% reduction in lipid peroxidation in cells compared to irradiated control.

Keywords: Sunscreens, *in vitro* methodology, Sun protection factor, response surface methodology, photochemoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Estrutura do Sol (adaptado de WOLPERT, 2017).	10
Figura I.2. Esquema ilustrativo das reações que ocorrem no Sol entre isótopos de hidrogênio formando um átomo de He e liberando energia (extraído de WOLINSKI, 2016).	11
Figura I.3. Espectro eletromagnético (adaptado de BIDINOTO e BELO, 2015).....	12
Figura I.4. Diagrama mostrando a porção UV do espectro solar (adaptado de GOUVÊA et al., 2014).	13
Figura I.5. IUV e relação com o risco de queimadura de pele (adaptado EPA, 2017).	14
Figura I.6. Esquema da estrutura da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de Genetic Home References, 2017).	15
Figura I.7. Esquema da epiderme (adaptado de TORTORA e DERRICKSON, 2016).....	16
Figura I.8. Diagrama mostrando profundidade de penetração da radiação UV na pele e a energia associada ao fóton de acordo com o comprimento de onda (adaptado de BATTIE e VERSCHOORE, 2012).	18
Figura I.9. Formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (A) e 6-4 pirimidina-pirimidona (B) a partir das bases pirimidínicas expostas à radiação UVB (adaptado de MONTAGNER& COSTA, 2009).	19
Figura I.10. A exposição da pele humana à radiação UVA induz a formação de estados fotoexcitados (S*) de cromóforos endógenos (S).....	20
Figura I.11. Estrutura química das vitaminas D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalfiferol). A vitamina D2 difere da vitamina D3 por apresentar uma ligação dupla e um grupo metila na cadeia lateral.	24
Figura I.12. Conversão do 7-DHC em pré-vitamina D3 induzida pela RUVB e equilíbrio dependente de temperatura entre pré-vitamina D3 e vitamina D (adaptado de DeLUCA, 2014).	26
Figura I.13. Resposta eritematosa solar vs comprimento de onda (SPRINGSTEEN et al., 1999).	29
Figura I.14. Linha do tempo do desenvolvimento dos protetores solares (adaptado de JENSEN et al., 2013).....	30

Figura I.15. Molécula do PABA: transferência de elétron do grupo doador (=NH ₂) para o grupo aceptor (=COOH) sob RUV (adaptado de MAIER e KORTING, 2005).	34
Figura I.16. Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor (SPRINGSTEEN et al., 1999).	38
Figura I.17. Esquema de funcionamento da esfera integradora (SPRINGSTEEN et al., 1999).	38
Figura I.18. Design experimental proposto.	42
Figura I.19. Esquema do procedimento experimental para determinar a eficácia de protetores solares empregando cultura celular (FIGUEIREDO, 2016).	44
Figura I.20. Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 20, 30, 50 e 60, obtidos da análise qualitativa por CLAE da fase orgânica (diclorometano) obtida no processo de extração (item 4.2.1). OCT = <i>octocrylene</i> ; AVO = <i>avobenzone</i> ; EHT: <i>ethylhexyl triazone</i> e BEMT = <i>Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine</i>	46
Figura I.21. Estrutura da quercetina (adaptado de VO et al., 2016).	48
Figura I.22. Espectro de absorção da solução padrão de quercetina (10 µg/ml) (linha pontilhada) versus complexo com AlCl ₃ (linha contínua).	49
Figura I.23. Esquema ilustrando a complexação da quercetina com ClAl ³⁺ , formando o complexo estável quercetina-Al ³⁺ (adaptado de FREDERICE; FERREIRA, GEHLEN, 2010).	49
Figura I.24. Espectro de absorção da SP (quercetina 10 µg/mL em etanol, adicionada de 6 gotas de AlCl ³⁺ 6%) analisada em 10 dias diferentes.	50
Figura I.25. Espectro da SP (quercetina 10 µg/mL em etanol, adicionada de 6 gotas de AlCl ³⁺ 6%) preparada no mesmo dia, em três dias distintos.	50
Figura I.26. Relação entre a quantidade de protetor solar (FPS 15) aplicado na face externa da cubeta de quartzo preenchida com SP e a área sob a curva de absorção obtida.	51
Figura I.27. Imagens microscópicas revelando os perfis de aplicação de protetores solares na face externa da cubeta de quartzo. A: perfil ótimo de aplicação. B e C: distribuição não homogênea e indesejável da amostra.	52
Figura I.28. Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras.	53

Figura I.29. Relação entre o log da ASC de absorbância versus o FPS dos protetores solares analisados.	53
Figura I.30. Proteção proporcionada pelos protetores solares de diferentes FPSs. (Retirado e adaptado de OSTEWALDER & HERZOG, 2009).	54
Figura I.31. (A) Medida da viabilidade celular das células L929 expostas ou não radiação UVB de 10 J/cm ² , protegidas ou não com os protetores solares com FPSs 15, 20, 30, 40, 50 e 60. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. Letras iguais significam ausência de diferença estatística (p<0,05), segundo teste de comparação múltipla de Tukey. (n=9). (B) Curva padrão obtida a partir do teste de viabilidade celular da linhagem L929 exposta à uma dose de 10J/cm ² de radiação UVB, protegida por formulações fotoprotetoras com diferentes FPS aplicadas sobre uma placa de quartzo (2 mg/cm ²).	57
Figura I.32. (A) Viabilidade celular da linhagem L929 exposta a 10J cm ² de radiação UVB. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. Marca A.....	57
Figura I.33. (A) Viabilidade celular da linhagem L929 exposta a 10J/cm ² de radiação UVB. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. Marca B.....	58
Figura I.34. (A) Viabilidade celular da linhagem L929 exposta a 10J/cm ² de radiação UVB. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. Marca C.....	58
Figura II.1. Fontes e respostas celulares às EROs e ERNs, derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [(M n+)] (VASCONCELOS et al., 2007).	66
Figura II.2. Desenho experimental de um planejamento do tipo ACC.....	68
Figura II.3. Planejamento do tipo Box-Behnken e distribuição dos níveis e fatores.	69
Figura II.4. Função de desejabilidade	64
Figura II.5. <i>Vaccinium macrocarpon</i> A.(cranberry)	70
Figura II.6. Compostos bioativos do <i>cranberry</i> (adaptado de CÔTÉ et al., 2010).	71
Figura II.7. Superfície de resposta para o teor de polifenóis totais (TPT) em função da (A) proporção planta:solvente (S/D) e tempo e (B) temperatura e S/D.....	84
Figura II.8. Superfície de resposta para a CI ₅₀ em função da (A) proporção planta:solvente (S/D) e temperatura, e (B) teor de sólidos totais em função do S/D e tempo.	84
Figura II.9. (A) radical difenilpicrilhidrazila e (B) molécula difenilpicrilhidrazina.....	85

Figura II.10. Medida da atividade redutora do radical DPPH• pelo extrato de otimizado de cranberry.....	86
Figura II.11. Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol.....	87
Figura II.12. Representação esquemática da reação de quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol para determinação de atividade antioxidante.	88
Figura II.13. Representação esquemática da indução da peroxidação lipídica in vitro.	89
Figura II.14. Medida da Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe ²⁺ . Os resultados representam a média de três determinações. p<0,05.	89
Figura II.15. Representação esquemática da redução metabólica da resazurina a resofurina. Figura adaptada de <www.promeqa.com.br> e WANG et al. (2014).....	90
Figura II.16. Medida da viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados por 24h com concentrações crescentes do extrato otimizado de cranberry. ** Significante em relação ao controle solvente; *** Muito significativo em relação ao controle solvente pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com p<0,05.	91
Figura II.17. Medida da geração de peróxidos lipídicos (expressa em quantidade de malondialdeído formado) pelos fibroblastos L929 tratados com 100 µg/mL de extrato otimizado de cranberry e submetidos à uma única dose de radiação UVB (200 mJ/cm ²). Os resultados representam a média de três determinações. Letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com p<0,05.....	92
Figura II.18. Espectro de absorção do extrato de cranberry em etanol 80%, 0,5 mg/mL.....	92
Figura II.19. Espectro de absorção das soluções hidroalcoólicas do extrato de cranberry (0,5 mg/mL) irradiadas durante 2h com luz UVA (A) e luz UVB (B).....	93
Figura II.20. Viabilidade de fibroblastos protegidos ou não por fotoprotetor comercial (FPS 15); por formulação contendo 2% de extrato otimizado de cranberry ou por formulação placebo. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. Os resultados representam a média de três determinações. Letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com p<0,05.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1. Lista de filtros solares aprovados pela ANVISA e FDA (adaptado ANVISA, 2006; BALOGH et al., 2011).	31
Tabela I.2. Composição ativa e FPSs dos protetores solares comerciais.	39
Tabela I.3. Condições cromatográficas.	41
Tabela I.4. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores.....	55
Tabela I.5. Resultados da repetibilidade do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores obtidos para a marca B.....	59
Tabela I.6. Resultados da repetibilidade do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores obtidos para a marca C.....	59
Tabela II.1. Principais antioxidantes endógenos e seus efeitos (CHEN; HU; WANG, 2010; KRYSTON et al., 2011).	67
Tabela II.2. Planejamento experimental para a escolha do melhor solvente para extração....	73
Tabela II.3. Parâmetros avaliados no estudo de otimização de extração do cranberry em pó por maceração dinâmica.	75
Tabela II.4. Composição da emulsão semi-sólida obtida.....	80
Tabela II.5. Caracterização dos extratos fluidos de cranberry obtidos por soxhlet....	79
Tabela II.6. Teor de polifenóis totais, sólidos totais e CI ₅₀ dos diferentes extratos fluidos de <i>cranberry</i> obtidos.....	84
Tabela II.7. Fatores significativos ($p \leq 0,05$) que influenciam o processo de extração de acordo com os parâmetros (respostas) analisados.....	85
Tabela II.8. Comparação entre os valores preditos e experimentais para as condições ótimas determinadas.....	84
Tabela II.9. Valores de FPS obtidos empregando a metodologia de Mansur.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4 PPs	6-4 pirimidina-pirimidona
7-DHC	7-dehidrocolesterol
A/O	Emulsão água em óleo
ABIHPEC	Associação Brasileira das Indústrias de Higiene, Perfumaria e Cosméticos
ACC	Arranjo Central Composto
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
API	Proteína ativadora 1
ASC	Área sob a curva
ASD	Proporção planta:solvente
AT	Tempo de extração
ATEMP	Temperatura
AVO	<i>Avobenzone</i>
BEMT	<i>Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine</i>
BHA	hidroxibutilanisol
BHT	hidroxibutiltolueno
CAT	Capacidade antioxidante total
CAT	Catalase
CG	Cromatografia gasosa
CI	Controle irradiado
CI50	Concentração inibitória 50
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNI	Controle não irradiado
COX	ciclooxigenase
CV	Coeficiente de variação

DBB	Design Box-Behnken
DEMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DME	Dose eritematosa mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPCs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DPR	Desvio Padrão Relativo
EB	Estrato Basal
EC	Estrato Córneo
EE	Estrato Espinhoso
EE	Efeito eritematogênico
EG	Estrato granuloso
EHT	<i>Ethylexyl triazone</i>
EL	Estrato Lúcido
ERC	Espécies reativas de carbono
ERCI	Espécies reativas de cloro
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FC	<i>Folin-Ciocalteau</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
GPK	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>

HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos
IPD	<i>Immediate pigment darkening</i>
IPL	Inibição da peroxidação lipídica
IUV	Índice Ultravioleta
JNK	Quinase c-Jun amino-terminal
LUMO	<i>Lowest Unnoccupied Molecular Orbital</i>
MAP	Quinase ativada por mitógeno
MDA	malondialdeído
ME	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinases matriciais
MSR	<i>Metodologia de superfície de resposta</i>
O/A	Emulsão óleo em água
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OCT	<i>octocrylene</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTC	<i>Over the counter</i>
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PAC	proantocianidinas
PG	Prostaglandinas
PMMA	polimetacrilato
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i>
PS	Protetor solar
RIV	Radiação infravermelha
RPM	Rotação por minuto
RUV	Radiação Ultravioleta

SAG	Síndrome da adaptação geral
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SP	Solução padrão
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TPT	Teor de polifenóis totais
TST	Teor de sólidos totais

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
CAPÍTULO I	4
Desenvolvimento de um método espectrofotométrico para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras	4
I.1 INTRODUÇÃO	5
I.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
I.2.1 O Sol: breve reflexão	8
I.2.2 Características gerais do Sol	9
I.2.3 Radiações Solares	11
I.2.3.1 Radiação visível	11
I.2.3.2 Radiação infravermelha	12
I.2.3.3 Radiação ultravioleta	13
I.2.4 A pele humana	15
I.2.5 Efeitos da RUV sobre a pele	18
I.2.5.1 Eritema	21
I.2.5.2 Bronzeamento	22
I.2.5.3 Imunossupressão	22
I.2.5.4 Síntese de vitamina D	24
I.2.5.5 Fotoenvelhecimento	26
I.2.6 Protetores solares: da estética à era da prevenção	27
I.2.7 Mecanismo de ação dos filtros solares	33
I.2.7.1 Filtros orgânicos	33
I.2.7.2 Filtros inorgânicos	34
I.2.8 Determinação da eficácia fotoprotetora <i>in vivo</i>	35
I.2.9 Avaliação de protetores solares <i>in vitro</i>	36
I.3 OBJETIVOS	39
I.4 MATERIAL E MÉTODOS	39

I.4.1 Amostragem.....	39
I.4.2 Caracterização qualitativa dos protetores solares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	40
I.4.2.2 Perfil cromatográfico	41
I.4.3 Desenvolvimento do método espectrofotométrico <i>in vitro</i> para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras.....	41
I.4.3.1 Obtenção da solução padrão	42
I.4.4 Validação	43
I.4.4.1 Precisão.....	43
I.4.4.2.1 Linhagem e cultivo celular.....	43
I.4.4.2.2 Determinação da eficácia fotoprotetora dos protetores solares comerciais	44
I.4.4.2.3 Viabilidade celular	44
I.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	45
I.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
I.6.1 Análise qualitativa da composição dos protetores solares comerciais por CLAE	45
I.6.2 Desenvolvimento de um método espectrofotométrico para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras	47
I.6.2.1 Obtenção da solução padrão	47
I.6.2.2 Aplicação das amostras de protetores solares comerciais.....	50
I.6.2.3 Delineamento experimental	52
I.6.2.3.1 Precisão.....	54
I.6.2.3.2 Exatidão	56
I.7 CONCLUSÕES	59
CAPÍTULO II.....	60
Otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i> A.)	60
II.1 INTRODUÇÃO.....	61
II.2 REFERENCIAL TEÓRICO	63
II.2.1 Estresse oxidativo	63
II.2.2 Planejamento experimental e função de desejabilidade	67
II.2.3 <i>Cranberry</i>	70
II.2 OBJETIVOS.....	72
II.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
II.3.1 Material botânico.....	72
II.3.2 Determinação do melhor solvente extrator.....	72

II.3.3 Determinação do teor de sólidos totais	73
II.3.4 Determinação do teor de polifenóis totais	73
II.3.5 Determinação da atividade redutora do DPPH•	74
II.3.6 Estudo de otimização do processo de extração do <i>cranberry</i> em pó por maceração dinâmica... 74	
II.3.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato <i>in vitro</i>	75
II.3.7.1 Medida da atividade doadora de íons H ⁺ ao radical DPPH	76
II.3.7.2 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol 76	
II.3.7.3 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica	76
II.3.8 Avaliação do extrato otimizado de <i>cranberry</i> em cultura de células.....	77
II.3.8.1 Linhagem e cultivo celular	77
II.3.8.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>cranberry</i>	77
II.3.8.3 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em cultura de células	77
II.3.8.4 Avaliação da fotoestabilidade do extrato de <i>cranberry</i>	78
II.3.8.5 Determinação da capacidade fotoprotetora do extrato de <i>cranberry</i>	78
II.3.8.6 Determinação <i>in vitro</i> do FPS	79
II.3.9 Análise estatística dos resultados.....	79
II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
II.4.1 Estudo para determinação do melhor solvente extrato do pó de <i>cranberry</i>	80
II.4.2 Estudo de otimização do processo de extração do <i>cranberry</i> em pó por maceração dinâmica... 82	
II.4.3 Avaliação da atividade antioxidante do extrato <i>in vitro</i>	85
II.4.3.1 Medida da atividade doadora de íons H ⁺ ao radical DPPH	85
II.4.3.2 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol 87	
II.4.4 Avaliação do extrato otimizado de <i>cranberry</i> em cultura de células.....	90
II.4.4.1 Citotoxicidade em fibroblastos de camundongo L929	90
II.4.4.2 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em L929.....	91
II.4.4.3 Espectro de absorção UV/Vis e avaliação da fotoestabilidade do extrato de <i>cranberry</i>	92
II.4.4.4 Determinação da atividade fotoprotetora em L929	93
II.4.4.5 Determinação <i>in vitro</i> do FPS	94
II.5 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96

CAPÍTULO I

Desenvolvimento de um método espectrofotométrico para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras

I.1 INTRODUÇÃO

A exposição à luz solar, principal fonte natural de radiação ultravioleta (RUV), é capaz de afetar diversos de processos biológicos. Suas ações benéficas à saúde humana estão associadas, sobretudo, à síntese de vitamina D, intimamente relacionada à prevenção de doenças crônicas (AUTIER e GANDINI, 2007; ANH et al., 2008; WANG, 2008; PITTAS, 2007). No entanto, a RUV é o principal fator etiológico responsável pelo eritema solar, envelhecimento cutâneo precoce, supressão do sistema imune, bem como pelo câncer de pele, incluindo melanoma e não melanoma (RAI; SHANMUGA; SRINIVAS, 2012; AMARO-ORTIZ; YAN; D’ORAZIO, 2014; POUR, 2015; PANICH, 2016; RIVAS, 2015; HOLICK, 2016).

Nas últimas décadas, um aumento expressivo no número de casos de melanoma tem sido reportado em todo o mundo. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS, EUA), em 2016, cerca de 76.000 pessoas foram diagnosticadas com melanoma, e 10.000 norte americanos vieram a óbito como resultado da doença; cuja incidência aumentou 15 vezes nos últimos 40 anos (ACS, EUA, 2016). O crescente número de casos de câncer de pele é um fenômeno observado também na Nova Zelândia, Austrália e Europa (MONTELLA, 2009; HOLTERHUES, 2010; APALLA et al., 2017). No Brasil, o número de mortes causadas por melanoma cresceu 55% em 10 anos (INCA, Brasil, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2020 a quantidade de novos casos de câncer de pele possa chegar a 15 milhões em todo o mundo (OMS, 2003).

Sem adentrar ao mérito da questão acerca dos sérios abalos físicos e emocionais causados pelo diagnóstico de um melanoma, outra consequência é o impacto financeiro aos sistemas de saúde para o manejo da doença (GORDON, 2015). Nos EUA, entre 2002 e 2011, os custos associados ao tratamento de câncer de pele aumentaram cinco vezes mais rápido do que tratamentos para qualquer outro tipo de câncer (GUY, 2014). O Conselho de Câncer da Austrália estima que o país gaste mais de 1 bilhão de dólares por ano tratando câncer de pele (CANCER COUNCIL, 2016). No Brasil, o grande número de casos do tipo não melanoma representa um impacto econômico de 21 milhões de dólares anualmente (SOUZA, 2011).

De acordo com a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2015), gastos com a saúde estão crescendo tão rapidamente que se tornarão insustentáveis nos níveis atuais. Sendo assim, é de suma importância reduzir custos por meio de programas de prevenção ao câncer de pele, uma vez que cerca de 80% dos casos de melanoma são passíveis de serem evitados por meio da implementação de medidas preventivas a nível primário, como a fotoproteção (UĞRLU Z, 2016; APALLA et al., 2017).

Uma fotoproteção adequada é essencial para prevenção dos efeitos nocivos provocados pela RUV (VERSCHOOTEN et al., 2006). A OMS recomenda uma tríade de medidas básicas que contribuem para a redução do desenvolvimento de desordens e patologias cutâneas associadas à superexposição à luz solar, que incluem: (i) limitar o tempo de exposição ao sol, especialmente nos horários de maior incidência de radiação UV (entre 10h e 16h); (ii) usar roupas e acessórios adequados, tais como chapéus e óculos de sol e, principalmente, (iii) utilizar protetores solares de amplo espectro, com fator de proteção solar (FPS) de 30 ou mais (OMS, 1994).

Associado à maior conscientização por parte da população acerca dos riscos da exposição excessiva ao Sol, o mercado de protetores solares está em ascensão, com estimativa de movimentar \$11,1 bilhões em 2020 (GIA, 2015). Especificamente no Brasil, o mercado de fotoprotetores cresceu 14%, com fluxo de R\$ 2,5 bilhões em 2015, e deve atingir R\$ 3,5 bilhões em vendas até 2018 (MINTEL, 2015). Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), apontam que o Brasil é responsável por cerca de 20% do consumo de protetores solares no mundo e 82% na América Latina (ABIHPEC, 2015). A Austrália, reconhecida por apresentar a maior incidência de melanoma do mundo (CLIMSTEINS, 2016), obteve um balanço positivo em 2015 em relação ao consumo de protetores solares, com um aumento de 2,5% em vendas. Além disso, há uma estimativa de crescimento do mercado de 4% entre 2017 e 2018 (EUROMONITOR, 2017).

Os dados apresentados acima revelam uma incoerência mundial preocupante já observada por alguns autores: o uso de protetores solares está aumentando proporcionalmente à incidência de doenças de pele associadas à RUV (RAMPAUL, 2008; AUTIER, 2009; FARAGE, 2009; PLANTA, 2011; MULLIKEN, 2012; ROGERS et al., 2012; GLAZER et al., 2017). As explicações plausíveis para este contrassenso têm sido discutidas. Estudos sugerem que altos níveis de FPS descritos nas embalagens dos produtos fotoprotetores tenham efeito negativo ao encorajar a população a permanecer exposta ao sol por longos períodos de tempo, aumentando assim, os riscos de desenvolvimento de câncer do tipo melanoma e não melanoma (AUTIER; BONIOL; DORÉ, 2007; YOUNG et al., 2010; AUTIER, 2007; IANNACONE, 2014). Além disso, o uso inadequado de protetores solares, incluindo aplicação insuficiente já foi analisado (BULLER et al., 2011; MIZUNO et al., 2016), no entanto, as verdadeiras causas permanecem desconhecidas.

Sendo assim, este trabalho traz à tona uma hipótese pouco explorada no meio científico, relacionada à qualidade dos protetores solares que chegam ao mercado. A eficácia dos protetores solares frente à RUV B é caracterizada pelo seu FPS e, na faixa do UVA, pelo *Persistent Pigment*

Darkening (PPD). Os dois métodos requerem análises *in vivo* que demandam a seleção de voluntários, acompanhamento de profissionais especializados, emprego de equipamentos de alto custo, além de se tratar de técnicas complexas e demoradas, ademais, levanta questões de cunho ético ao expor voluntários à RUV (COLIPA, 2011). Por essas razões, estes testes são realizados somente na fase final de desenvolvimento de formulações fotoprotetoras e não são repetidos durante a produção do produto em escala industrial.

Um fator agravante que invoca a questão da qualidade dos protetores solares que chegam ao mercado é que, atualmente, não há exigência para que as empresas realizem testes regulares de controle de qualidade em seus produtos para confirmar as indicações de rotulagem. Dito isto, não pode ser negligente que o FPS possa diferir entre os lotes piloto os lotes de produção disponíveis para venda.

Com o intuito de contornar este problema, em geral, grupos de pesquisadores ao redor do mundo têm desenvolvido métodos *in vitro* para a determinação do FPS por medidas de absorção/transmissão de radiação UV através de películas de protetores solares aplicadas em diferentes substratos, bem como soluções diluídas dos fotoprotetores (MANSUR, 1986; OLIVEIRA, 2008; HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ e MIKULA, 2011; HUPPEL, 2011; RUVOLO, 2014; OLIVEIRA, 2015) e, mais recentemente, uma técnica inovadora que utiliza a determinação de parâmetros biológicos em cultura celular (FIGUEIREDO, 2016). No entanto, até o momento, o FDA não propôs uma substituição do método *in vivo* para estabelecer o FPS, uma vez que a capacidade de substratos para simular a pele humana e a falta de dados sobre características de desempenho de substratos como quartzo ou pele artificial em ensaio *in vitro*, é um fator limitante (STANFIELD et al., 2010; PELIZZO, 2012).

A alternativa sugerida neste trabalho não tem a pretensão de substituir o método *in vivo* para cálculo do FPS, ao contrário, a técnica inédita apresentada é uma contribuição do Controle de Qualidade, subárea das Ciências Farmacêuticas, que se apoia nos três pilares definidos aqui como (i) qualidade, (ii) eficácia e (iii) credibilidade dos produtos farmacêuticos junto ao mercado consumidor, à fotoproteção. Para tanto, apresentamos um procedimento baseado em uma análise espectrofotométrica rápida, pouco dispendiosa e robusta, para identificar desvios de qualidade durante a produção em escala, utilizando como amostra padrão formulações fotoprotetoras disponíveis no mercado, as quais tiveram o FPS obtido por meio de testes *in vivo* na fase final de desenvolvimento dos mesmos.

A perspectiva é que o método aqui proposto possa ser empregado pelas indústrias cosméticas com o intuito de testar seus protetores solares em intervalos regulares, garantindo que diferentes lotes ainda obedeçam às reivindicações do rótulo. A expectativa é que, assegurando a

qualidade dos fotoprotetores, os produtos que chegam ao mercado realmente cumpram com sua função de proteger a pele contra os efeitos nocivos da RUV, quem sabe assim, contribuindo para redução da incidência de doenças de pele associadas à exposição à luz solar.

I.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

I.2.1 O Sol: breve reflexão

As Ciências da Natureza permitem poucos espaços para convicções, restando-nos a humilde posição de observadores e questionadores. No entanto, nos habituamos aos fenômenos naturais que nos cercam, tais como a transição entre o dia e a noite; radiação Solar; chuva; vento; arco-íris; a própria existência da vida na Via Láctea; etc., atribuindo a estes eventos certa desimportância resultante de sua banalidade. Com isso, o assombro diante de questões grandiosas relacionadas às condições que permitem e afetam a vida na Terra é, na maioria das vezes, lamentavelmente, dissipado.

Dentro do contexto fenomenológico da natureza, O Sol, nome da única estrela pertencente ao Sistema Solar, sem dúvida, é um dos corpos celestes mais deslumbrantes e dignos de perplexidade do Espaço Sideral.

Nos primórdios da civilização, o Homem cultuava e adorava o Sol como um deus responsável pela existência e manutenção da vida na Terra. Sendo assim, o Sol já foi chamado de *Helios* pelos gregos, de *Mitras* pelos persas e de *Rá* pelos egípcios (MILONE et al. 2013). Sol, o nome que conhecemos hoje, tem sua origem na palavra do vocabulário Indo-Europeu *Sawel*, que pode ser traduzida como “brilhar”, “iluminar” (SOUSA, 2011).

“*Tão certo quanto o nascer do Sol*” é uma figura de linguagem largamente utilizada para garantirmos que algo se realizará. Esse cotidiano padrão, por hora aparentemente imutável, faz descer sobre nosso olhar crítico e questionador, inerente a todos os seres humanos, o véu da banalidade que nos mantêm atrelados ao senso comum e parece tornar desnecessária a reflexão acerca da importância do Sol.

De fato, o Sol desempenha um papel indispensável à existência da vida, que vai além de nossas percepções: quase todas as formas de vida na Terra evoluíram tendo o Sol como a principal influência. Um exemplo clássico dessa preponderância é o próprio nascer e o pôr do sol, que definiu o ritmo circadiano, ao qual a maioria dos mamíferos ainda responde biologicamente através da exposição regular à luz e à escuridão (DUFFY e CZEISLER, 2009; TSANG, et al., 2016). No entanto, um equilíbrio é necessário. A exposição exagerada à luz

solar traz uma série de malefícios à saúde humana que serão discutidos mais adiante, mas que tem o poder de fazer-nos contemplar sobre nossa fragilidade diante de uma estrela tão extraordinária quanto o Sol.

Para as linhas que se seguem, convido o leitor a não apenas adquirir dados e enriquecer seus conhecimentos sobre o Sol e seus efeitos sobre nossos organismos, mas a uma profunda meditação, despertando o pensamento reflexivo acerca da magnanimidade, perfeição e equilíbrio da vida dentro do Sistema Solar.

I.2.2 Características gerais do Sol

A despeito de aceitarmos a presença do Sol no céu de maneira trivial, ao submetemos esta estrela à curiosidade, ela mostra-se um corpo celeste profuso e fascinante.

Passaram-se 1600 anos da era Cristã sem ninguém conjecturar que o Sol e as demais estrelas observadas no céu noturno eram o mesmo tipo de corpos celestes. Agora, sabemos que o Sol é uma das cerca de 100 bilhões de estrelas de nossa galáxia, a Via Láctea, e que, existem provavelmente 2 trilhões de galáxias no Universo. O Sol possui aproximadamente 5 bilhões de anos, encontra-se a uma distância de 150 milhões de quilômetros da Terra, o que corresponde a 8 minutos-luz (TAYLOR, 1997).

O Sol ocupa uma posição na periferia da Via Láctea, conhecida como braço de *Orion*, distante cerca de 27.000 anos-luz do centro da galáxia. O Sistema Solar movimenta-se a uma velocidade média de 720.000 km/h. No entanto, demora em torno de 230 milhões de anos para realizar uma órbita completa ao redor da Via Láctea (BATTERSBY, 2011).

Para compreendermos o Sol, a princípio é necessário considerarmos suas dimensões e características, no mínimo, estarrecedoras: apresenta um raio de 695.000 km, equivalente a 109 vezes o raio da Terra. Sua massa corresponde a $1,989 \times 10^{33}$ kg; 333.000 vezes maior que a massa terrestre. A sua densidade é de $1,41 \text{ g/cm}^3$, com temperatura média, em sua superfície, de $5.500 \text{ }^\circ\text{C}$ e luminosidade de 10^{33} ergs/s (NASA, 2017).

Como centro gravitacional do Sistema Solar, o Sol é a principal fonte de energia luminosa para a Terra. É composto por 73,46% de hidrogênio, o elemento mais abundante do Universo; 24,85% de hélio e 1,69% de demais elementos, incluindo ferro; oxigênio; carbono; nitrogênio e magnésio, entre outros (BRIGGS; CARLISLE; POPPE, 2016).

A atmosfera solar é composta pela fotosfera, cromosfera e pela coroa - zona mais externa e tênue (figura I.1). Da fotosfera vem a maior parte da luz visível, e é onde são observadas as manchas solares, indicadoras de campos magnéticos intensos na região. A coroa,

por sua vez, possui brilho equivalente ao da lua cheia, e é melhor observada durante os eclipses totais do Sol, pois ela fica obscurecida quando a fotosfera é visível. Esta camada também possui regiões ativas, de alta temperatura e densidade, onde se observa o fenômeno das explosões solares (*flares*), que ocorrem com maior frequência em períodos de máxima atividade solar (MILONE et al., 2003; PETER et al., 2014).

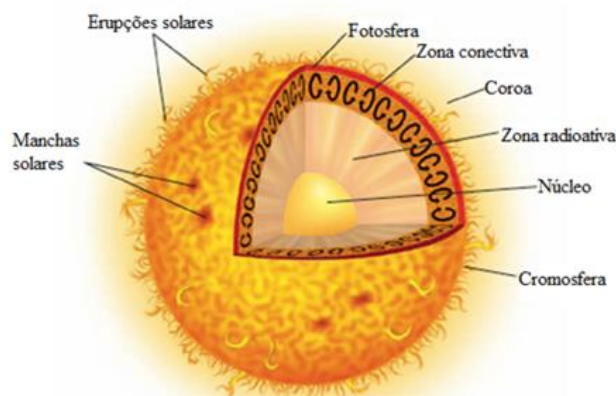


Figura I.1. Estrutura do Sol (adaptado de WOLPERT, 2017).

A energia emitida pelo Sol, na forma de ondas eletromagnéticas, é gerada em seu núcleo, que possui raio equivalente a um quarto do raio total da estrela. No núcleo, as pressões e as temperaturas são elevadas o suficiente para forçar a fusão, isto é, as reações nucleares em que núcleos de átomos mais leves, como o hidrogênio (H) e seus isótopos (deutério e trítio) e hélio (He), se fundem gerando novos elementos químicos (MILONE et al., 2003). Aproximadamente 600 milhões de toneladas de H são convertidas em He a cada segundo, através do processo nuclear denominado "ciclo próton-próton", elucidado por Bethe (1939), o que lhe valeu o prêmio Nobel em 1967 (TERUYA e DUARTE, 2012; MENDONÇA, 2013).

O ciclo próton-próton (figura I.2) necessita de uma condição superior a 4 milhões kelvin (K) para ser efetivo, viabilizado pela temperatura nuclear que atinge 15 milhões K. Da energia de fusão, parte é usada para manter as condições de temperatura e pressão internas, e o restante é irradiado pela superfície em forma de raios gama, raios-X, UV, luz visível, radiação infravermelha e ondas de rádio (figura I.3) (SEEDS e BACKMAN, 2016). A potência emitida é de $3,9 \times 10^6 \text{ W/m}^2$. Toda essa energia leva 10^7 anos para ser transportada do interior até à superfície solar. Ao se deslocar no espaço, com a velocidade da luz, a energia é distribuída em

esferas concêntricas de raios cada vez maiores. Ao chegar à órbita terrestre, a radiação está atenuada em 1367 W/ m^2 (McCLUNEY, 2014).

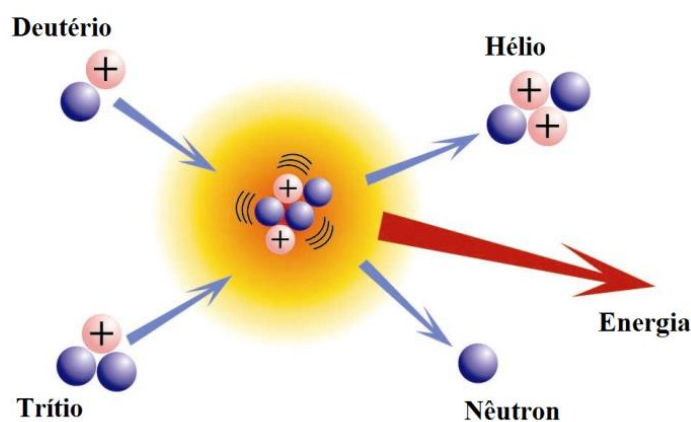


Figura I.2. Esquema ilustrativo das reações que ocorrem no Sol entre isótopos de hidrogênio formando um átomo de He e liberando energia (extraído de WOLINSKI, 2016).

I.2.3 Radiações Solares

I.2.3.1 Radiação visível

Em 1666, Sir Isaac Newton exemplificou a natureza policromática da luz através do célebre experimento que a submetia à passagem através de um prisma, gerando um espectro colorido, fortalecendo a hipótese de que a luz branca era composta por diferentes cores, cada qual com um índice de refração, com comprimentos de onda que variam de 400-700 nm (Figura I.3). As cores formadas são violeta, anil, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho (MOLLON, 2003; SLINEY, 2016).

A luz visível causa poucos efeitos sobre a pele, sendo o mais notável, a pigmentação escura e persistente após exposições múltiplas à radiação visível (RANDHAWA et al., 2015). No entanto, é importante citar que esta radiação atua sobre a secreção de melatonina, hormônio que regula o ritmo do sono; estimulação esta que ocorre, principalmente, por meio dos olhos (TOSINI; FERGUSON; TSUBOTA, 2016).

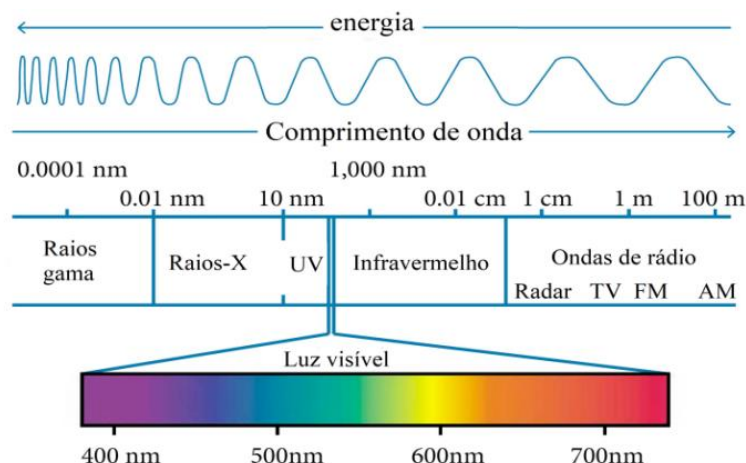


Figura I.3. Espectro eletromagnético (adaptado de BIDINOTO e BELO, 2015).

I.2.3.2 Radiação infravermelha

O astrônomo William Herschel (1738-1822), em 1800, conduziu um experimento com o intuito de determinar a potência de aquecimento dos raios solares visíveis separando-os através de um prisma e medindo a temperatura de cada cor. Herschel descreveu um aumento na temperatura à medida que o termômetro era movido da região vermelha até a violeta do arco-íris. Sua curiosidade levou-o a determinar a temperatura na região além da cor vermelha do espectro, onde não há luz visível e, constatou que as temperaturas eram mais altas nessa região. A partir dessa observação, deduziu a presença de raios caloríficos invisíveis, denominados radiação infravermelha (RIV) (HERSCHEL, 1800).

Atualmente sabemos que a RIV corresponde a 54,3% de toda a radiação que atinge a superfície terrestre com comprimento de onda superior a 760 nm, podendo chegar a 1 mm (figura I.3) e, é subdividida em três bandas: RIV-A (760-1400 nm), IRV-B (1400-3000 nm) e RIV-C (3000 nm - 1 mm) (HOLZER e ELMETS, 2010).

No corpo humano, a RIV é percebida como calor, e pode penetrar profundamente na pele, atingindo até a hipoderme, onde provoca a dilatação dos vasos sanguíneos, estimulando a circulação e o metabolismo geral. Estudos demonstram que seu efeito térmico protege as células cutâneas cultivadas em laboratório contra efeitos deletérios causados pelos raios UV, sugerindo que a RIV é mais benéfica do que maléfica à pele humana (BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016).

I.2.3.3 Radiação ultravioleta

Em 1801 Johan Ritter descobriu a região do espectro solar conhecida como ultravioleta, em virtude de sua ação física ser decorrente de uma energia cuja frequência é maior que a da cor visível violeta (BARTH, 1987).

A fotobiologia moderna iniciou com o trabalho de Niels Finsen, que, entre os anos de 1893 a 1896, provou que as queimaduras solares eram causadas pela RUV e não pelo calor, como se imaginava (TAN e LINSKEY, 2011). O entendimento da radiação UV e suas consequências à saúde humana, como é discutido mais adiante neste trabalho, está em constante evolução. De maneira geral, o espectro UV tem um efeito sobre o envelhecimento da pele, desenvolvimento de queimaduras, produção de lesões pré-cancerosas e cancerosas, e imunossupressão. A radiação UV possui os menores comprimentos de onda e equivale a 10% da energia total emitida pelo Sol. Compõe apenas uma pequena região do espectro eletromagnético, situada entre uma frequência de 100 a 400 nm, subdividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm) (figura I.4) (BESARATINIA, 2011).

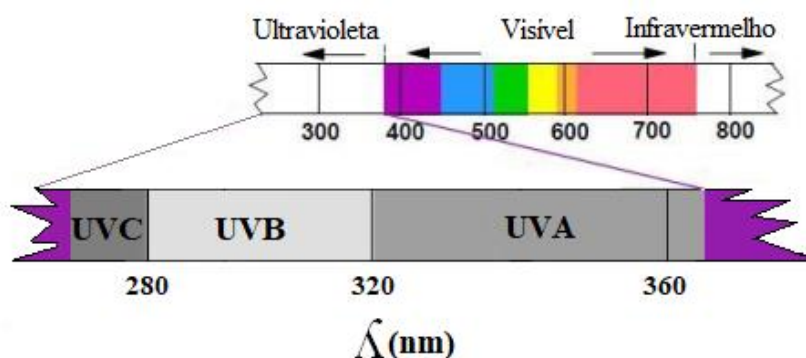


Figura I.4. Diagrama mostrando a porção UV do espectro solar (adaptado de GOUVÊA et al., 2014).

O índice UV (IUV) é uma escala indicativa da intensidade de RUVB que atinge a superfície terrestre, relacionada à capacidade desta de induzir o eritema na pele humana. Essa escala tem como objetivo simplificar a informação acerca dos níveis de RUV para o público leigo de acordo com uma tabela de valores inteiros, onde zero é o menor valor, enquanto o maior valor geralmente é representado pelo símbolo 11+. No entanto, é importante ressaltar que não há limite superior. Quanto maior o IUV, maiores os níveis de radiação e a probabilidade de ocorrer queimadura solar é aumentada (figura I.5) (SCHALKA et al., 2014).



Figura I.5. IUUV e relação com o risco de queimadura de pele (adaptado EPA, 2017).

A camada de ozônio na atmosfera terrestre absorve 100% da radiação UVC, cerca de 90% da UVB, e praticamente nada da UVA; sendo assim, os níveis de ozônio na estratosfera influenciam diretamente o IUUV. Impactos antropogênicos aceleram a degradação da camada de ozônio e este processo pode provocar um aumento da taxa de RUV que atinge a superfície terrestre (RAFIEEPOUR, 2015). Portanto, em localizações onde a camada de ozônio é menos densa, como Austrália e Nova Zelândia, bem como em regiões próximas à linha do Equador, como Tailândia e América Central, o IUUV é mais intenso (CHIPPERFIELD, 2015).

Ademais, a variação temporal diária e estação-a-estação também influencia tal intensidade. A hora do dia é um fator importante, a concentração máxima de RUV ocorre entre 10h e 16h, por esse motivo, recomenda-se evitar a exposição solar durante esse intervalo (POUR et al., 2015).

A partir de uma perspectiva sazonal, durante o verão, há mudança da inclinação do eixo de rotação da Terra em relação ao Sol. Isto permite à radiação UV penetrar a atmosfera terrestre de forma menos tangencial, com redução do albedo e maior utilização de energia. Durante um dia típico de verão, o espectro UV que atinge a superfície terrestre consiste em 3,5% de UVB e 96,5% de UVA (ANDERSEN et al., 2010; KORACÍ e KHAMBHOLJA, 2011).

A posição geográfica também altera a exposição aos raios UV. Tal efeito se explica da seguinte forma: quanto mais elevada a latitude, maior a distância que a radiação solar precisa viajar através da atmosfera (portanto, maiores perdas), e maior a área da superfície da Terra sobre a qual uma determinada quantidade de radiação é distribuída. Logo, diminuir latitudes e elevar altitudes aumenta a incidência de RUV. A cada 1 km de altitude, a incidência de RUV se eleva de 10 a 25% (CORDERO et al., 2014).

I.2.4 A pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, perfazendo em torno de 15% do peso total de um Homem adulto. Corresponde a uma área de aproximadamente 1,7 m² (ZAIDI E LANIGAN, 2010). Sua espessura varia de menos de 0,05 mm nas pálpebras a quase 1,5 mm nas regiões palmares e plantares (HARRIS, 2009). A complexa estrutura da pele associa vários tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica dispostos em três camadas, que obedecem à seguinte ordem (i) epiderme e seus anexos; (ii) derme e (iii) hipoderme (figura I.6), transformando-a em uma barreira efetiva de proteção contra agentes agressores exógenos, tais como microrganismos, elementos químicos e físicos, incluindo radiação UV; além de manter a temperatura e a homeostase corporal (KANITAKIS, 2002; ROMANOVSKI, 2014; BOER et al., 2016; LOPEZ-OJEDA; OAKLEY, 2017).

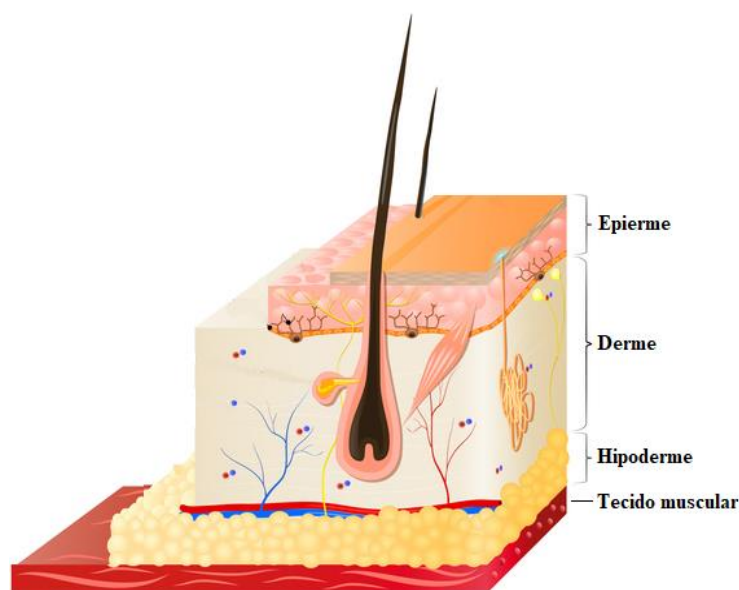


Figura I.6. Esquema da estrutura da pele: epiderme, derme e hipoderme (adaptado de Genetic Home References, 2017).

A epiderme, a camada mais externa da pele, é composta predominantemente por queratinócitos, mas também abriga melanócitos e células dendríticas, como as células de Langerhans. De acordo com GILBERT (2000), podem ser distinguidas cinco camadas no epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme: (i) o estrato basal (EB); (ii) estrato espinhoso (EE); (iii) estrato granuloso (EG); (iv) estrato lúcido (EL) e, (v) estrato córneo (EC) (figura I.7).

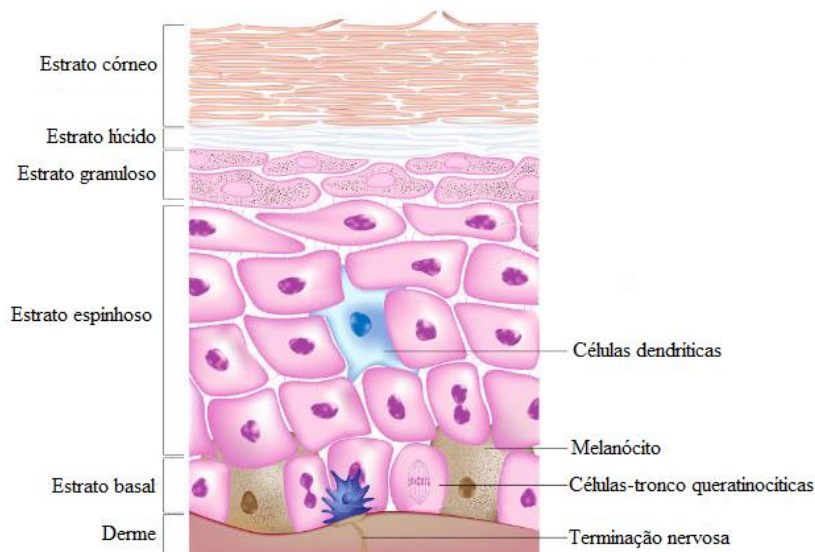


Figura I.7. Esquema da epiderme (adaptado de TORTORA e DERRICKSON, 2016).

O EB contém as células-tronco da epiderme. Em virtude de sua intensa atividade mitótica, este estrato também foi denominado germinativo. Queratinócitos migram constantemente a partir do estrato basal, diferenciam-se em corneócitos e atingem a superfície da pele ou, o EC. Estas células são continuamente eliminadas pelo processo fisiológico de descamação do EC (BREITKREUTZ et.al, 2013).

Logo acima do estrato basal, encontra-se o EE, constituído por várias camadas de queratinócitos poliédricos que exibem curtas projeções citoplasmáticas (tenofilamentos), ligadas por desmossomos às projeções das células adjacentes, o que confere à camada um aspecto espinhoso (daí o nome, estrato espinhoso) e contribui para a resistência da epiderme ao atrito (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011). Nesse estrato, são mais facilmente encontradas as células dendríticas apresentadoras de antígenos, conhecidas como células de Langerhans. Estas fagocitam e processam os antígenos na pele e os apresentam aos linfócitos T na própria epiderme ou nos linfonodos regionais, iniciando assim uma resposta imunológica. As células de Langerhans, portanto, participam das dermatites alérgicas por contato e da rejeição de transplantes cutâneos (JAITLEYS e ARASWATHI, 2012; YOSHIDA et al., 2014).

A diferenciação celular continua com o EG, assim denominado, pois suas células caracterizam-se pela presença de grânulos de querato-hialina, os quais são organelas citoplasmáticas de alto peso molecular compostas por profilagrinas e citoqueratinas, precursores da filagrina e do envelope queratinizado da camada córnea, respectivamente. Os

queratinócitos do EG sintetizam ainda, colesterol, ácidos graxos livres, ceramidas e o glicolípido acilglicosilceramida, que são exocitados para o espaço intercelular, cimentando as células e formando uma barreira impermeável à água, impedindo a dessecação da pele (SUGAWARA et al., 2013).

O estrato lúcido encontra-se entre o estrato granuloso e a camada córnea e, corresponde a uma fina camada de células anucleadas, mortas e ricas em queratina. Contém uma substância graxa semifluida denominada eleidina, responsável por hidratar as estruturas da pele. No entanto, essa camada está presente apenas em locais onde a pele é mais espessa, como nas regiões palmo-plantares, por exemplo (MAO et al., 2013).

O EC é a camada mais externa da epiderme, composta por aproximadamente trinta estratos de células achatadas e mortas, semelhante a escamas, resultado da queratinização ou cornificação dos queratinócitos a partir do estrato basal. Este processo dura em média de 26 a 28 dias. Após, as células do EC sofrem descamação para que as novas células das camadas mais profundas as substituam. Desta forma, a pele está em constante renovação (HOAT, 2014).

A derme situa-se entre a epiderme e o tecido subcutâneo e é responsável pela variação regional na espessura da pele. É composta principalmente por colágeno, mas também contém elastina, vasos sanguíneos, terminações nervosas e glândulas sudoríparas. A derme, portanto, é responsável pela força mecânica e pela maioria das sensações na pele. A principal célula dérmica é o fibroblasto, que produz a matriz extracelular (ME), uma rede complexa formada por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanas, proteínas não colagênicas e microfibrilas, tais como o colágeno do tipo VI e microfibrilas associadas à elastina. A ME tem a função de modular a estrutura, fisiologia e biomecânica da pele e outros tecidos. A derme é ainda dividida em derme papilar e reticular. A derme papilar é localizada abaixo da junção dermo-epidérmica e contém uma mistura solta de fibrócitos, colágeno e vasos sanguíneos. Logo abaixo da derme papilar, há a derme reticular muito mais espessa. Contém menos fibrócitos, mas uma quantidade mais densa de colágeno (PROST-SQUARCIONI et al., 2008; KRIEG e AUMAILLEY, 2011).

Por fim, antes de atingir a musculatura, encontramos o tecido subcutâneo denominado hipoderme, constituído majoritariamente por células adiposas, fibroblastos e células tronco derivadas do tecido adiposo. Sua função está relacionada à reserva de energia, proteção contra choques mecânicos e isolamento térmico (KOBBER et al., 2015).

I.2.5 Efeitos da RUV sobre a pele

A RUV emitida pela luz do Sol compreende a faixa do espectro eletromagnético situada entre 100 e 400 nm, e é dividida em três regiões de acordo com o comprimento de onda: UVC (100-280 nm); UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm), cada qual com um limite característico de eficiência na penetração cutânea (figura I.8) (RAMASAMY et al., 2017; YOUNG; ROSSI; CLAVEAU, 2017). A luz UVC apresenta a maior energia e elevada capacidade mutagênica, porém não consiste em sério risco à saúde humana, uma vez que é totalmente absorvida pelo ozônio atmosférico, sendo assim, não atinge a superfície terrestre (D’ORAZIO et al., 2013; BALOGH et al., 2011).

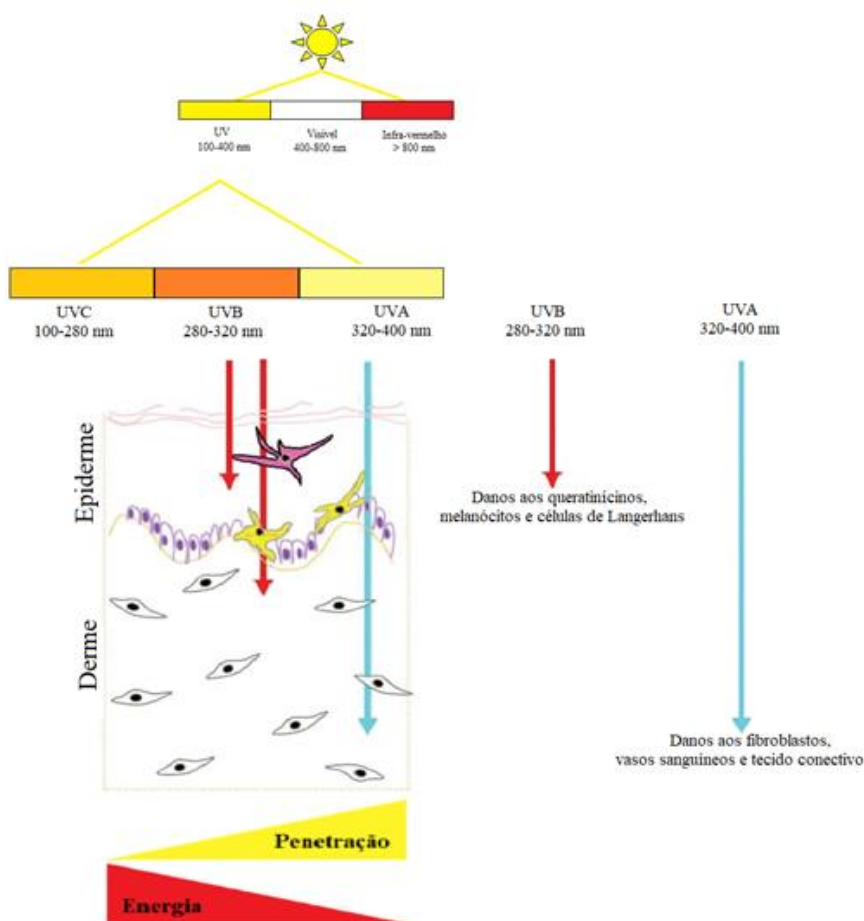


Figura I.8. Diagrama mostrando profundidade de penetração da radiação UV na pele e a energia associada ao fóton de acordo com o comprimento de onda (adaptado de BATTIE e VERSCHOORE, 2012).

Os raios UVB equivalem a 5% da luz UV solar total, sendo capaz de transpor toda a extensão da epiderme, podendo atingir parcialmente a derme. É considerada essencial para a conversão do ergosterol em vitamina D, bem como, a principal responsável por causar

bronzeamento, eritema solar e, por uma série de patologias cutâneas, incluindo o carcinoma basocelular, espinocelular e melanoma (PACHOLCZYK; CZERNICKI; FERENC, 2016).

A radiação UVB atua fundamentalmente por meio de mecanismos diretos de lesão ao DNA (figura I.9), o qual ao absorver fótons de energia com comprimentos de onda menores, referentes à banda UVB, origina imediatamente uma série de reações de dimerização entre bases de pirimidina adjacentes, levando à formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (DPCs) e (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs) (PANICH, 2016). Estes fotoprodutos, a nível molecular, parecem ser responsáveis por distorções significativas na dupla fita do DNA, interferindo nos mecanismos celulares, que em conjunto, induzem múltiplos efeitos sobre o sistema imunológico, desempenhando um papel importante na geração e manutenção da carcinogênese (YU; LEE, 2017; SCHUCH et al., 2017). Também provoca efeitos deletérios indiretamente ao alterar o equilíbrio redox celular através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CADET; DOUKI; RAVANAT, 2015; CHANG et al., 2016).

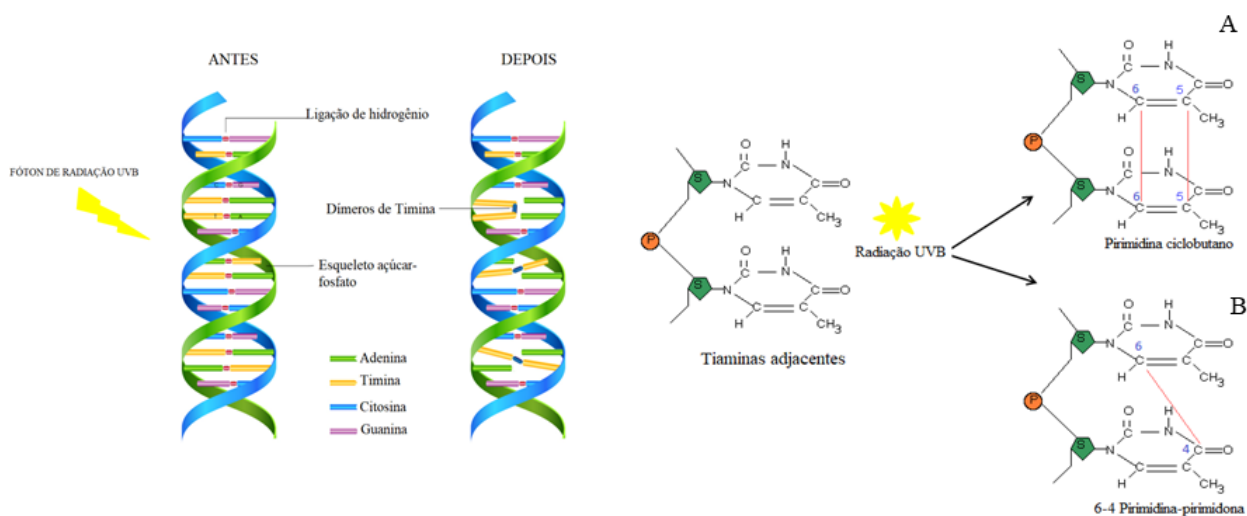


Figura I.9. Formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (A) e 6-4 pirimidina-pirimidona (B) a partir das bases pirimidínicas expostas à radiação UVB (adaptado de MONTAGNER & COSTA, 2009).

O espectro UVA compreende a radiação mais abundante na superfície terrestre, perfazendo aproximadamente 95% de toda luz solar UV incidente. Somando-se a isto, possui a melhor eficiência de penetração cutânea, podendo atingir 1000 μm de profundidade, afetando tanto queratinócitos quanto fibroblastos na derme; por essa razão pode ser responsável pela maioria dos danos crônicos associados ao fotoenvelhecimento cutâneo (AMARO-ORTIZ; YAN; D'ORAZIA, 2014; SAGE; GIRARD; FRANCESCONI, 2012). Em contraste à radiação UVB, a UVA, ao atingir o DNA produz apenas um pequeno número de dímeros de pirimidina

na pele; por outro lado, é extremamente eficaz em fotosensibilizar cromóforos endógenos, tais como porfirinas, riboflavinas, bases nucleotídicas, aminoácidos e seus derivados (ácido urocânico, por exemplo), originando EROs (BREM; GUVEN; KARRAM, 2016; WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2005). Entre estas, destacam-se os radicais livres ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxila (HO^{\bullet}) e oxigênio singlete (1O_2) (CADET & WAGNER, 2013).

As EROs alteram drasticamente a função celular através da oxidação dos lipídeos das membranas biológicas, alterando sua fluidez e diminuindo a eficiência do transporte transmembrana; interação com proteínas; fragmentação e mutação da estrutura do DNA nuclear e mitocondrial, favorecendo o fotoenvelhecimento cutâneo, a imunossupressão, bem como, a patogênese do melanoma (PIZZINO et al., 2017; BARRERA, 2012). Portanto, sugere-se que grande parte da ação mutagênica e carcinogênica da radiação UVA é mediada pelas EROs (KARRAN & BREM, 2016).

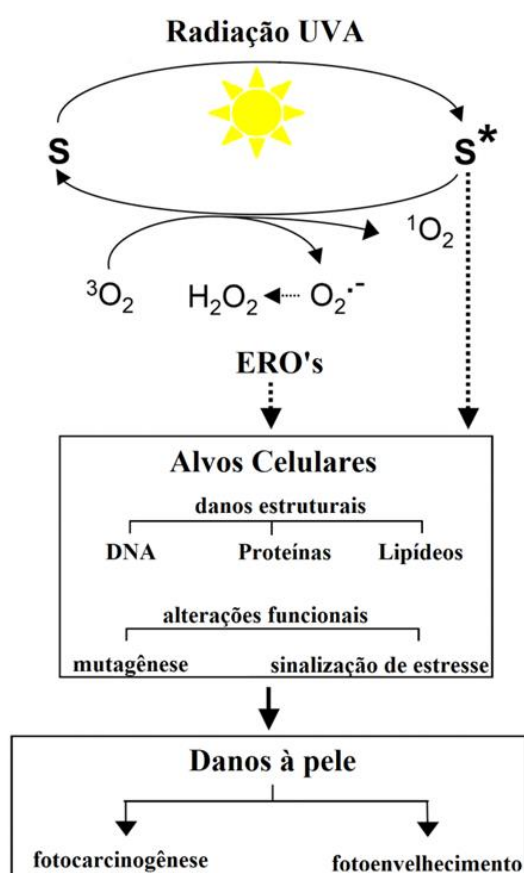


Figura I.10. A exposição da pele humana à radiação UVA induz a formação de estados fotoexcitados (S^*) de cromóforos endógenos (S) (adaptado de WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2005).

Embora as células possuam um mecanismo natural de defesa antioxidante para neutralizar EROs, o qual inclui sistemas enzimáticos (Superoxido dismutase; glutathione peroxidase; catalase) e não-enzimáticos (α -Tocoferol; ácido ascórbico; carotenoides; glutathione reduzida), estes podem ser rapidamente esgotados, ocasionando uma alteração fisiológica no equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, culminando em um estado denominado estresse oxidativo, que parece ser responsável pelo envelhecimento cutâneo e desordens patológicas (KATALANIC et al., 2006; KRYSTON et al., 2011).

I.2.5.1 Eritema

O eritema é a alteração fisiológica aguda mais comum provocada, principalmente, pela exposição aos raios UVB, sendo resultado da inflamação ocorrida na pele e estando associado aos sinais clássicos de inflamação, ou seja, rubor, dor, calor, edema e perda da função, cuja intensidade é proporcional à quantidade de radiação absorvida pela superfície cutânea (HARRISON e YOUNG, 2002).

A faixa UVA também promove eritema, mas é necessária uma intensidade de radiação mil vezes maior que a fração do UVB para causar a mesma resposta eritematosa. O intervalo de tempo para UVA produzir eritema e bronzeamento é bifásico. É frequentemente evidenciado de imediato no final do período de exposição; e desaparece em algumas horas, seguindo-se de eritema retardado que começa 6h após e atinge seu pico em 24h. O espectro de ação para UV induzir bronzeamento e eritema são quase os mesmos; entretanto, a UVA é mais eficiente em induzir bronzeamento, enquanto a UVB é mais eficiente em causar eritema (RAI; SHANMUGA; SRINIVAS, 2012; D'ORAZIO et al., 2013; WEATHERHEAD; FARR; REYNOLDS, 2013).

O eritema causado por UVB origina-se imediatamente após o início da exposição e possui duração de alguns minutos, enquanto que a fase tardia inicia-se após 3 a 4h, atinge o máximo em 12 a 24h, desaparece dentro de 1-3 dias e é, então, substituído por pigmentação. Também pode vir acompanhado de vesículas e descamação da pele (SINGH, 2017). O aumento da dose de radiação diminui o período de latência e aumenta a persistência da reação eritema (RAVNBAK; PHILIPSEN; WULF, 2010).

I.2.5.2 Bronzeamento

A radiação UV estimula a síntese de melanina, causando o bronzeamento imediato e posterior. O verdadeiro bronzeamento inicia-se 48h após a exposição ao sol, atinge grau máximo em três semanas e depois diminui, caso a exposição seja interrompida (BRENNER e HEARING, 2008; JUZENIENE e MOAN, 2012).

A pigmentação imediata (IPD – *Immediate Pigment Darkening*), a qual ocorre segundos após exposição à UVA e à luz visível e desaparece dentro de 2 horas, é resultado da foto-oxidação da melanina existente na pele. A pele torna-se marrom enquanto exposta, mas desbota rapidamente após a exposição (WICKS et al., 2014)

Em doses maiores de UVA (8-25 J/cm²), a pigmentação imediata é seguida pela pigmentação que está presente entre 2 e 24h após a exposição, a qual é referida como pigmentação persistente (PPD – *Persistent Pigment Darkening*) (HWANG et al., 2011; PELIZZO et al., 2012). Similar à IPD, a PPD é resultado da foto-oxidação da melanina pré-existente (WICKS et al., 2014). O bronzeamento tardio, o qual tem seu pico 72h após exposição à RUV, é causado pelo aumento da atividade da tirosinase e formação de nova melanina, levando ao crescimento do número de melanócitos, dos melanossomas, do grau de melanização e do número de melanossomas transferidos aos queratinócitos (TADOKORO et al., 2005).

A produção de melanina é uma forma de defesa do organismo contra a agressão da RUV, podendo aumentar a resistência à queimadura solar em 10 vezes nas pessoas de pele branca e em 50 vezes nas de pele negra (BRENNER e HEARING, 2008; JABLONSKI e CHAPLIN, 2010; D’ORAZIO et al., 2013).

Durante o bronzeamento, o aumento da melanina permite bloquear a maior parte da radiação UVA e do espectro visível, e os dois terços da UVB que conseguem ultrapassar a camada córnea. No entanto, ainda há controvérsias sobre os efeitos fotoprotetores da melanina, uma vez que o bronzeamento não protege contra o envelhecimento induzido (BRENNER e HEARING, 2008; D’ORAZIO et al., 2013).

I.2.5.3 Imunossupressão

A exposição à radiação UV é, provavelmente, o fator ambiental mais importante capaz de causar efeito imunossupressor resultante de uma complexa cascata de alterações imunológicas locais e sistêmicas iniciada por cromóforos endógenos (NORVAL, 2001; HALLIDAY, BYRNE, DAMIAN, 2011).

De fato, a imunossupressão mediada pela radiação UV, com ênfase à UVB, foi descrita pela primeira vez em 1976, por Kripke e colaboradores. Neste estudo, os autores demonstraram que a radiação UV é capaz de suprimir a imunidade mediada por células T regulatórias. Os autores observaram que tumores de pele altamente antigênicos transplantados em camundongos previamente irradiados com luz UV não foram rejeitados. Por outro lado, em camundongos singênicos saudáveis transplantados, porém não irradiados, não foi observada a progressão do tumor (KRIPKE e FISHER, 1976; SCHWARZ, 2008).

A partir do indício de uma ligação imunológica entre a exposição prévia de camundongos à radiação UV e o desenvolvimento de tumores nestes animais, uma série de estudos foram delineados com o intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos (LEWIS, et al., 2011; RENA et al., 2008; ULRICH, 2007; VAID et al., 2013). Atualmente, não se contesta que a exposição à radiação UV é capaz de suprimir o sistema imunológico tanto em animais quanto em humanos, porém os processos moleculares que conduzem à sub-regulação são bastante complexos, podendo envolver diferentes vias (NORVAL; HALLIDAY, 2011).

De um modo geral, o processo se inicia a partir da absorção de fótons por cromóforos da pele (DNA, ácido urocânico e fosfolípídeos de membrana, por exemplo), iniciando uma complexa cascata de eventos moleculares que culmina em alterações imunológicas locais e sistêmicas, resultando na proliferação de células regulatórias T e B e, inibição da ativação de células T efetoras e de memória (NORVAL; HALLIDAY, 2011). As células de Langerhans epidérmicas constituem o principal alvo da radiação UV, dessa forma, alterações estruturais e funcionais, tais como perda de dendritos, redução da expressão de moléculas HLA (*human leucocyte antigen*), de moléculas de adesão e de co-estimulação, mediados pela luz UV a esta subclasse de células dendríticas, tornam-se um importante mecanismo de imunossupressão, uma vez que inibe sua função de identificação, processamento e apresentação de antígenos neoformados ao sistema imunológico (ULRICH, 2007; VAID et al., 2013).

Acreditava-se, até a última década, que a radiação UVA fosse inócua ao sistema imunológico, no entanto, estudos recentes têm demonstrado o espectro superior da banda UVA, que compreende a região UVA-I (360-380 nm) possui um papel importante na imunossupressão (DAMIAN et al., 2011; MATHEWS et al., 2010a; MATHEWS et al., 2010b).

Em adição, uma série de ensaios clínicos aponta que produtos fotoprotetores contendo apenas proteção contra a radiação UVB são incapazes de prevenir os efeitos imunossupressores causados pela radiação UV. Em contrapartida, protetores solares com o mesmo FPS, porém acrescidos de filtros UVA de alta proteção, demonstraram reduzir de maneira significativa a supressão do sistema imunológico, indicando que a radiação UVA está diretamente implicada

na imunossupressão (DAMIAN; MATHEWS; HALLIDAY, 2010; HALLIDAY; BYRNE; DAMIAN, 2011; MOYAL e FORTANIER, 2008). Em doses equivalentes a 15-20 minutos de exposição ao sol do meio-dia, a radiação UVA contribui com cerca de 75% para imunossupressão mediada pela luz solar (HALLIDAY, 2011).

Diante desses fatos, assume-se que a radiação UVA contribuiu majoritariamente para a depressão do sistema imunológico, como resultado da exposição solar diária acidental (DAMIAN et al., 2011).

I.2.5.4 Síntese de vitamina D

A vitamina D, também conhecida como calciferol, compreende um grupo de moléculas secosteróides derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) solúveis em lipídios, cujas principais formas são vitamina D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalciferol) (WACKER e HOLICK, 2013). Da dieta, é possível obter apenas 10-20% das necessidades de vitamina D, sendo que as principais fontes de vitamina D3 são representadas pelos peixes de águas profundas e frias, como atum e salmão. Já a vitamina D2 é encontrada principalmente em fungos comestíveis. Os 80-90% restantes são sintetizados endogenamente (ANCHINATHAN e LIM, 2012). A molécula da vitamina D2 difere da D3 não apenas pela sua origem, como também por apresentar em sua estrutura um carbono a mais, um grupo metil extra e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 (figura I.11). No entanto, tais diferenças não afetam o mecanismo de ativação (síntese), e ambas agem como pró-hormônios (ROSS et al., 2011).

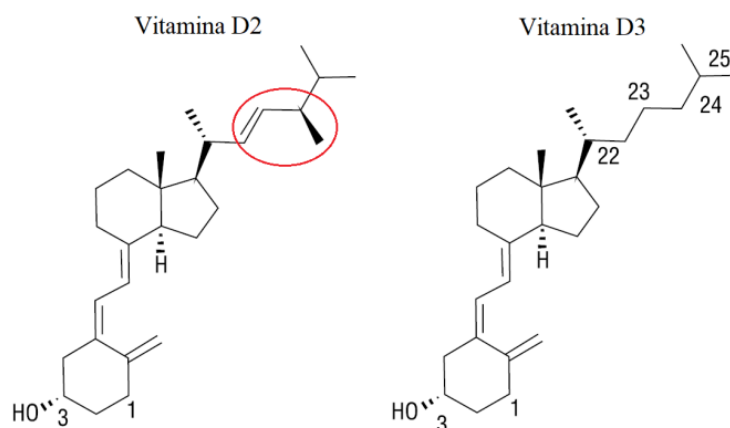


Figura I.11. Estrutura química das vitaminas D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalciferol). A vitamina D2 difere da vitamina D3 por apresentar uma ligação dupla e um grupo metila na cadeia lateral.

Durante a exposição à luz solar, o 7-DHC localizado na membrana lipídica das células presentes nas camadas mais profundas da epiderme (estrato basal e espinhoso - figura I.7) absorve comprimentos de onda entre 280 e 320 nm, referentes à banda UVB, e sofre quebra fotolítica da ligação entre carbonos 9 e 10 do anel B do ciclo pentanoperidrofenantreno, dando origem à molécula secosteróide pró-vitamina D3 (CUTOLO, 2008). Esta última, por sua vez, caracteriza-se por apresentar um dos anéis rompidos, causando termoinstabilidade, e, por essa razão, em presença de calor, sofre reação de isomerização assumindo configuração mais estável, a vitamina D3, secretada para o espaço intracelular, atingindo a corrente sanguínea (figura I.12) (WACKER e HOLICK, 2013). Ao alcançar o fígado, as vitaminas D2 e D3 sofrem hidroxilação no carbono 25, dando origem a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], a forma circulante principal, e que acoplada à glicoproteína ligadora de vitamina D, é transportada a vários tecidos cujas células contêm a enzima 1- α -hidroxilase (CYP27B1), uma proteína mitocondrial da família do CYP450 que promove hidroxilação no carbono 1 da 25(OH)D, formando a 1- α ,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH)₂D ou calcitriol], a forma biologicamente ativa, que desempenha um papel importante na regulação do metabolismo de cálcio e fosfato para manutenção de funções metabólicas e para a saúde esquelética (JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2014).

Portanto, a vitamina D é crucial à saúde óssea, uma vez que é responsável pela regulação do metabolismo, absorção de cálcio e fósforo. No entanto, os efeitos da vitamina D não estão limitados à homeostase mineral. A presença de receptores de vitamina D em outros tecidos pode ser igualmente importante na regulação parácrina e autócrina, promovendo o crescimento e diferenciação celular (ALSHAHRANI e ALJOHANI, 2013).

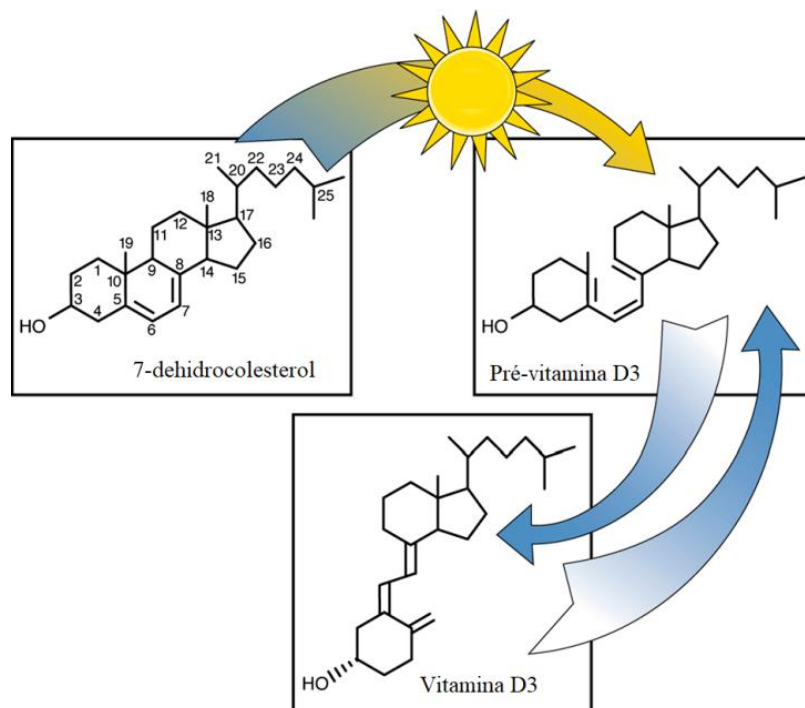


Figura I.12. Conversão do 7-DHC em pré-vitamina D3 induzida pela RUVB e equilíbrio dependente de temperatura entre pré-vitamina D3 e vitamina D (adaptado de DeLUCA, 2014).

I.2.5.5 Fotoenvelhecimento

O fotoenvelhecimento trata-se de um processo cumulativo que depende do grau de exposição às radiações UVA e UVB e, da pigmentação cutânea. A pele envelhecida pelo sol caracteriza-se clinicamente por aspereza, irregularidade da superfície, hipo ou hiperpigmentação, telangiectasias, ríttides, queratoses actínicas, perda da elasticidade (aparência coriácea), coloração cutânea amarelo-citrina em virtude da diminuição dos vasos sanguíneos e aparecimento de lesões pré-malignas e malignas (HASHIZUME, 2004; PANDEL, et al., 2013; TROJAHN et al., 2015).

De maneira sucinta, o mecanismo de fotoenvelhecimento envolve o aumento da expressão das metaloproteinases matriciais (MMP) pelas EROs geradas a partir da exposição da pele à radiação UV (PHILIPS et al., 2011; QUAN et al., 2013; PITTAYAPRUEK et al., 2016). As MMPs degradam os componentes da matriz extracelular. Em paralelo, receptores celulares de superfície, incluindo o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor de citocina, são estimulados pela RUV nos queratinócitos e fibroblastos. Três vias envolvendo proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) são então ativadas: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun amino-terminal (JNK), e p38. Essas vias convergem no núcleo celular, e dois componentes de fator de transcrição, cFos e cJun, combinam-se para formar o complexo ativador

1 (AP1). AP-1 então estimula a transcrição dos genes de MMP para produzir collagenase, gelatinase e estromelisina-1. Estas enzimas degradam colágeno, elastina e outros componentes da matriz extracelular. A ativação de c-Jun pelo complexo AP-1, após exposição à radiação UV, leva também à inibição da síntese de pró-colágeno do tipo I e tipo III pela redução da expressão dos genes e codificadores destes peptídeos (KARIMIPOUR et al., 2009; QUAN, et al., 2009; CHERNG; CHEN; SHIH, 2012; PARK, et al., 2017).

Uma vez no espaço extracelular, o colágeno maduro fica suscetível à ação deletéria de três tipos principais de collagenases: MMP-8 (colagenase 2), MMP-13 (colagenase 3) e MMP-1 (colagenase 1), sendo que esta última é a principal enzima collagenolítica ligada à degradação do colágeno, induzida pela radiação UV. A desnaturação do colágeno promovida por essas enzimas origina fragmentos chamados de gelatina, que será degradada em seguida por outras metaloproteinases matriciais: gelatinase (MMP-9) e estromelisina (MMP-3) (QUAN et al., 2009; PITTAYAPRUEK et al., 2016).

Dessa maneira, a radiação UV danifica o tecido conjuntivo dérmico, entre outras ações deletérias, por degradar o colágeno maduro e inibir a síntese de pró-colágeno. A degradação enzimática do colágeno é seguida por uma tentativa de reparo da matriz dérmica. No entanto, o reparo não acontece perfeitamente levando à formação de uma estrutura falha que prejudica a organização do colágeno no espaço intracelular. Este defeito na matriz é, então, chamado de "microcicatriz solar", e o acúmulo se manifesta clinicamente como as rugas (AMARO-ORTIZ; YAN; D'ORAZIO, 2014; IMOKAWA e ISHIDA, 2015).

I.2.6 Protetores solares: da estética à era da prevenção

De acordo com Balogh et al. (2011), protetores solares são formulações cosméticas contendo substâncias ativas denominadas filtros solares, classificados em agentes orgânicos e inorgânicos, respectivamente, de acordo com a capacidade de absorção ou reflexão da radiação (LATHA et al., 2013; BENS, 2014; SHETTY, 2015).

Atualmente o mercado oferece uma extensa variedade de produtos fotoprotetores nas mais diversas apresentações: loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O), aerossóis, bastões, entre outras. Tal pluralidade advém do extenso percurso da fotoproteção, que sempre esteve presente, de alguma forma, na história da civilização. Embora o conhecimento de causa fosse limitado ao apelo estético; no decorrer dos séculos, muitas substâncias foram, provavelmente, testadas como possíveis fotoprotetores (URBACH, 2001; STALLINGS e LUPO, 2009). No antigo Egito, o óleo de oliva era utilizado

como protetor solar. Além disso, as mulheres empregavam tintas e giz para branquear os rostos. O mesmo acontecia na Grécia e em Roma (RIGEL, 2011).

Na Inglaterra do século XVI, a rainha *Elizabeth I* tinha por hábito aplicar uma mistura de clara de ovo, borato de sódio, alume e sementes de papoula, embora também utilizasse derivados de mercúrio na face para obter uma aparência pálida. Tais comportamentos tinham, presumivelmente, finalidades estéticas, no entanto, podem ter sido empregados como uma maneira de proteger a pele contra a luz solar (HILTON, 2016).

Em períodos precedentes à Revolução Industrial, o tom claro da pele era sinônimo de status: uma pele pálida indicava que alguém tinha o privilégio de ficar em casa, enquanto a pele mais escura sinalizava uma vida de trabalho pesado ao ar livre. No entanto, com as mudanças no modelo de produção e consumo de bens, a tonalidade de pele da classe trabalhadora foi redefinida de escuro para uma variação mais pálida. A razão era que muitas pessoas abandonaram a agricultura para trabalhar em fábricas e minas de carvão, reduzindo a exposição da pele ao Sol. Contudo, no final do século XIX e início do século XX, o conceito acerca da tonalidade da pele mudaria: as classes sociais altas, em parte por razões de saúde, desfrutavam férias no litoral, expondo-se periodicamente a um índice de radiação solar mais elevado. Dessa maneira, a pele bronzeada passou a ser associada à saúde, bem-estar e prosperidade financeira (TRAN; SCHULMAN; FISHER, 2008; CHANG et al., 2014)..

O advento da moda influenciou de maneira significativa a fotoproteção. Na década de 1920, a estilista francesa *Gabrielle Coco Chanel* lançou a tendência do bronzeado após exibir pele dourada como resultado de uma viagem de cruzeiro feita por *Chanel* de Paris à Cannes. Logo, a tonalidade bronzeada foi adotada por milhares de mulheres na França, vinculando a pele morena à elegância e saúde (AZOULAYHER, 2009). No entanto, a descoberta de Hausser e Vahle, em 1922, que associava o bronzeamento ao risco eritema, principalmente após a exposição solar aos comprimentos de onda entre 280 e 315 nm (figura I.13), trouxe à tona a hipótese de que seria possível proteger a pele através da filtragem desses comprimentos de onda específicos.

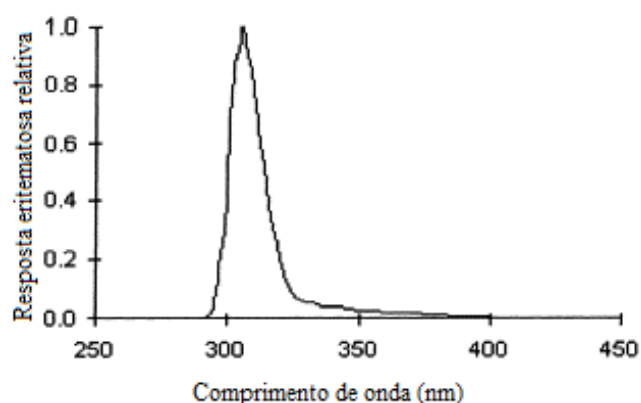


Figura I.13. Resposta eritematosa solar vs comprimento de onda (SPRINGSTEEN et al., 1999).

A ideia tentadora resultou em um crescente interesse na pesquisa por uma variedade de agentes fotoprotetores (LIM; HÖNIGSMAN; HAWK, 2007).

O histórico do desenvolvimento racional de fotoprotetores, apresentado resumidamente na figura I.14, inicia-se em 1928, nos EUA, onde foi lançado o primeiro protetor solar comercial do mundo. No entanto, os fotoprotetores só foram amplamente utilizados a partir de 1944, quando a Segunda Guerra Mundial movimentava os campos de batalhas e muitos soldados sofriam sérias queimaduras solares. Diante de tal infortúnio, um farmacêutico chamado *Benjamin Greenes* empenhou-se em desenvolver algo que pudesse proteger os combatentes dos danos causados pela RUV. Assim ele criou uma substância vermelha e viscosa, a qual denominou *red vet pet* (petrolato veterinário vermelho), derivada do petróleo, cujo mecanismo de ação baseava-se no bloqueio físico dos raios solares, agindo como uma espécie de filtro solar inorgânico de eficácia limitada, pois além de ser um produto com aspecto sensorial desagradável, em virtude de sua característica viscosa, deveria ser aplicado em espessas camadas para tornar-se eficaz (MONTEIRO, 2010). Um ano antes, em 1943, havia sido desenvolvido o PABA (ácido p-aminobenzoico) e seus derivados, considerado por muitos anos o filtro favorito nos EUA (DE PAULA et al., 2012).

Com o fim da Segunda Guerra Mundial, um grande número de filtros solares passou a ser sintetizado, testado e comercializado. Em 1947, Grady publicou um artigo intitulado “Óxido de Zinco em pós faciais” (tradução livre) no primeiro volume do *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. Neste trabalho, o autor discute de maneira integral o espectro de absorção de vários óxidos metálicos, incluindo óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂). Além disso, em uma observação quase profética, Grady previu a aplicabilidade do ZnO como filtro solar UVA (GRADY, 1947).

Em 1962, a benzofenona (ácido 3-benzil, 4-hidróxi, 6-metóxi-benzenosulfônico) foi introduzida ao mercado por sua capacidade absorvedora na região do UVA (MILESI e

GUTERRES, 2002). A partir da década de 1970, a popularização de férias em regiões ensolaradas, influenciada, sobretudo, pela queda dos preços de passagens aéreas, estimulou a demanda por protetores solares de ampla proteção, favorecendo o desenvolvimento de produtos mais sofisticados, com a incorporação de filtros UVB em formulações menos oleosas e mais agradáveis ao toque (JENSEN et al., 2013).

Em 1978, o FDA, órgão norte americano responsável pela regulamentação do uso de filtros solares, publicou o primeiro guia com metodologias para formulação e avaliação de protetores solares (FDA 1978). Em 1993, o guia foi atualizado com novas regras, propondo a obrigatoriedade de testes de eficácia e adequação das embalagens de fotoprotetores com o termo FPS (FDA, 1993). O guia passou por diversas atualizações até a versão mais recente, publicada em 2011 (FDA, 2011).

A década de 1980 promoveu grandes avanços à área da fotoproteção: a aprovação do primeiro filtro exclusivamente UVA: dibenzoilmetano e seus derivados (avobenzona). Desde então, tornou-se possível o desenvolvimento de formulações com proteção UVB e UVA simultaneamente (SILVA et al., 2015). Outro importante aperfeiçoamento aconteceu em 1989, como acertadamente previu Grady 42 anos antes, com a incorporação de óxidos metálicos micronizados ZnO e TiO₂ aos protetores solares, que em sinergia com filtros orgânicos, forneciam uma proteção mais efetiva na faixa do UVA (SCHALKA e REIS, 2011).

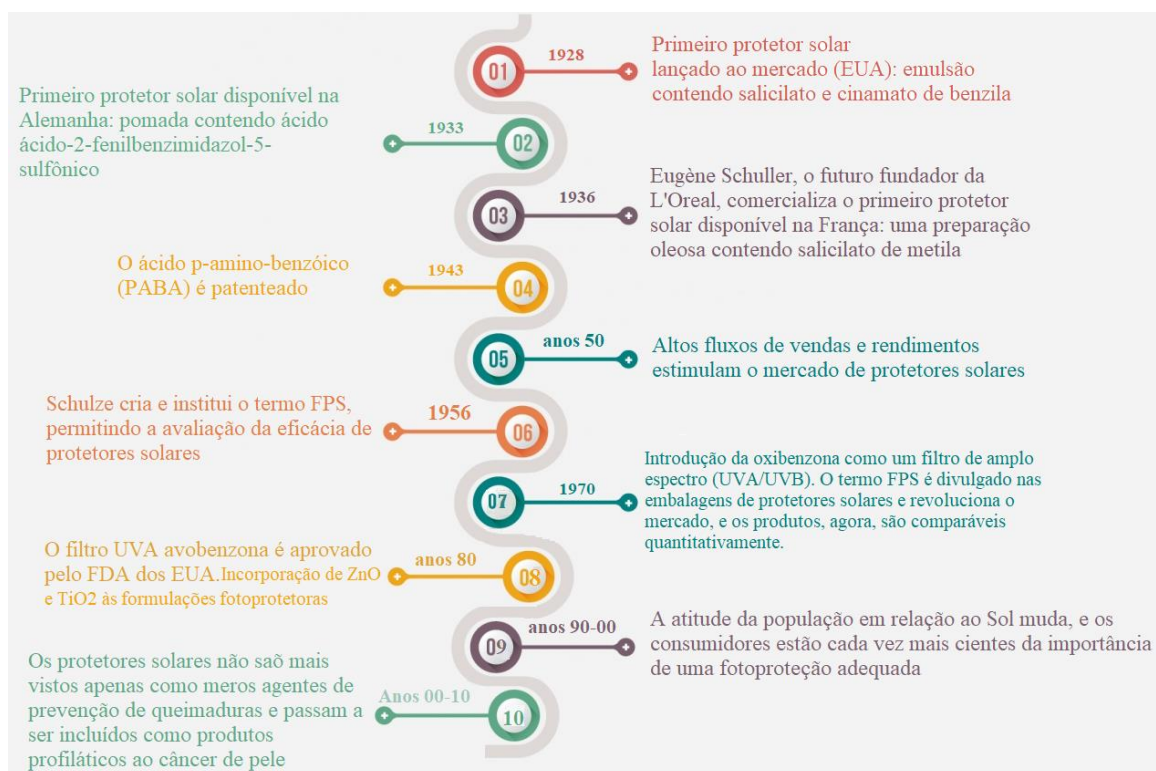


Figura I.14. Linha do tempo do desenvolvimento dos protetores solares (adaptado de JENSEN et al., 2013).

No decorrer dos anos, uma série de filtros UVB e UVA foram desenvolvidos. A tabela I.1 descreve, de acordo com a Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI), os filtros solares aprovados para uso no Brasil e nos EUA. Nela, observa-se que o número de filtros aprovados pelo FDA é inferior aos disponíveis para uso no Brasil, isso porque nos EUA, o processo de aprovação regulatória de novos filtros é burocrático, porque estes são classificados como produtos OTC (*over-the-counter*, ou seja, medicamentos isentos de prescrição), enquanto que no Brasil e Europa, os filtros solares são classificados como cosméticos pelas agências reguladoras (SHAATH, 2007; BALOGH et al., 2011; FDA, 2013; HAYDAR e BURKHART, 2013)

Tabela I.1. Lista de filtros solares aprovados pela ANVISA e FDA (adaptado ANVISA, 2006; BALOGH et al., 2011).

Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura INCI	Ação UVA	Ação UVB	ANVISA	FDA	% Máx.
Sulfato de Metila de N, N, N-trimetil – 4 – (2,oxoborn – 3 – ilidenometil) anilínio	Camphor benzalkonium methosulfate	-	+	+	-	6%
Salicilato de trietanolamina	Tea salicylate	-	+	+	+	12%
3, 3' – (1, 4 – fenilenodimetileno)bis (ácido 7, 7 – dimetil – 2 – oxo – biciclo – (2.2.1) 1heptilmetanosulfônico e seus sais	Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid (& salts)	+	-	+	+	10%
1 – (4 – terc – butilfenil) – 3 – (4 – metoxifenil) propano – 1, 3 – diona	Butyl methoxy dibenzoil methane (Avobenzone)	+	-	+	+	5%
Ácido alfa – (2 – oxoborn – 3 – ilideno) tolueno – 4 – sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina	Benzylidene camphor sulfonic acid & salts	-	+	+	+	6%
2 – Ciano – 3, 3' – difenilacrilato de 2 – etilhexila	Octocrylene	-	+	+	+	10%
4 – Metoxicinamato de 2 – etoxietila	Cinoxate	-	+	+	+	3%
2, 2' – dihidroxi – 4 – metoxibenzofenona	Benzophenone – 8 (PABA)	-	+	+	-	3%
Antranilato de mentila	Methyl anthranilate	+	-	+	+	5%
Ácido 2 – fenilbenzimidazol – 5 – sulfônico e seus sais de potássio, sódio e trietanolamina	Phenylbenzylimidazol sulfonic acid (& sodium, potassium, tea salts)	+	+	+	+	8%
4 – Metoxicinamato de 2 – etilhexila	Octyl (ou ethylhexyl) methoxycinnamate		+	+	+	10%
2 – Hidroxi – 4 – metoxibenzofenona	(Oxibenzona) benzophenone – 3	+	+	+	+	10%

Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura INCI	Ação UVA	Ação UVB	ANVISA	FDA	% Máx.
Ácido 2 – hidroxi – 4 – metoxibenzofenona – 5 – sulfônico e seu sal sódico (Sulisobenzona e Sulisobenzona sódica)	Benzophenone – 4 (acid)	+	+	+	+	10%
Benzophenone – 5 (Na)		+	+	+	-	5%
Ácido 4 – aminobenzóico	PABA	-	+	+	+	15%
Salicilato de homomentila	Homosalate	-	+	+	+	15%
Polímero de N – {(2 e 4)[(2 – oxoborn – 3 – ilideno) metil] benzil} acrilamida	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	-	+	+	-	6%
*Dióxido de titânio	*Titanium dioxide	+	+	+	+	25%
N – Etoxi – 4 – aminobenzoato de etila	PEG - 25 PABA	-	+	+	-	10%
4 – Dimetil-aminobenzoato de 2 – etilhexila	Octyl (ou ethylhexyl) dimethyl PABA	-	+	+	-	8%
Salicilato de 2- etilhexila	Octyl (ou ethylhexyl) salicilate	-	+	+	+	5%
4 – Metoxicinamato de isopentila	Isoamylp – methoxycinnamate	-	+	+	+	10%
3 – (4’ – metilbenzilideno) – d – 1 – cânfora	4 – methyl benzylidene camphor	-	+	+	+	4%
3 – Benzilideno cânfora	3- benzylidene camphor	-	+	+	-	2%
2, 4, 6 – Trianilin – (p – carbo – 2’-etil –hexil-1’oxi) 1,3,5 triazina	Octyl (ou ethylhexyl) triazone	-	+	+	-	5%
*Óxido de zinco	*Zinc oxide	+	+	+	+	25%
2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-{2-metil-3(1,3,3,3,-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)disiloxanil}propil}fenol	Drometizole trisiloxane	+	+	+	+	15%
Ácido benzóico,4,4’-[[6-[[4-[[(1,1-dimetiletil)amino]carbonil]fenil]amino]-1,3,5-triazina2,4-diil]diimino]bis-,bis(2-etilhexil)	Dioctyl (ou diethylhexyl) butamidotriazone	-	+	+	-	10%
2,2’-metileno-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4(tetrametil-butil)-1,1,3,3-fenol Metileno bis-benzotriazolil tetraetil butil fenol	Methylene bis-benzotriazolonyl tetramethylbutylphenol	+	+	+	+	10%
Sal monossódico do ácido 2,2’-bis-(1,4fenileno)- 1H-benzimidazol-4,6-dissulfônico	Bisimidazylate	+	-	+	-	10%
(1,3,5)-triazina-2,4-bis{[4-(2-etilhexiloxi)-2hidróxi]-fenil}-6-(4-metoxifenil)	Anisotriazine	+	+	+	-	10%
Dimeticodietilbenzalmalonato	Polysilicone-15	-	+	+	+	10%

Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura INCI	Ação UVA	Ação UVB	ANVISA	FDA	% Máx.
Éster hélfico do ácido 2-[4-(dietilamino)-2hidroxibenzoil]-benzóico	Diethylamino hydroxybenzoyl hexil benzoate	-	+	+	-	10%

* Filtros inorgânicos

Na tabela I.1, os filtros solares destacados em cinza, correspondem aos ativos mais encontrado em formulações fotoprotetoras no Brasil, sendo o TiO₂ o mais frequente, aparecendo em 70% dos protetores solares, seguido pela anisotriazina, presente em 66,3% (GODINHO et al., 2017).

I.2.7 Mecanismo de ação dos filtros solares

I.2.7.1 Filtros orgânicos

Os filtros orgânicos são basicamente compostos aromáticos com grupos carboxílicos, nomeadamente derivados do PABA, ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, entre outros (ARAÚJO, 2008; APEL; TANG; EBINGHAUS, 2017). Apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou metoxila na posição *orto* ou *para* do anel aromático, permitindo o compartilhamento de elétrons ressonantes por quase toda a extensão da molécula, tornando-a capaz de absorver e converter a RUV em radiações inofensivas ao ser humano, tais como radiação infravermelha ou em emissões de fluorescência ou fosforescência na faixa do visível e calor (KULLAVANIJAYA e LIM, 2005; LATHA et al., 2013; NASH e TANNER, 2014; MENG et al., 2017).

De maneira sucinta, a absorção da RUV promove a excitação dos elétrons situados do orbital HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), onde a energia é mais alta, para o orbital π^* LUMO (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), que possui uma energia discreta e bem definida. Os elétrons, ao retornarem ao estado inicial, liberam o excesso de energia em forma de calor (figura I.15) (FLOR e DAVOLOS, 2007; KNIGHT, 2009). Se a energia absorvida não for dissipada, as ligações químicas podem quebrar, resultando em uma degradação do filtro UV (BRIASCO et al., 2017).

A maioria destes filtros é efetiva apenas em uma estreita faixa do espectro UV. Por essa razão, protetores solares à base destes compostos, frequentemente apresentam em sua formulação diferentes tipos de filtros orgânicos, cada qual atuando em uma região específica

do espectro UV. Em geral, tais substâncias são ativas especialmente contra os raios UVB (KORAC e KHAMBHOLJA, 2011).

Fotoprotetores que contêm filtros orgânicos são úteis para proteger a pele contra os danos induzidos pela radiação ultravioleta, porém esta proteção não é ideal devido ao uso inadequado, incompleto espectro de proteção e toxicidade, além de problemas de fotoestabilidade apresentados pela maioria destes (GASPAR & CAMPOS, 2007; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

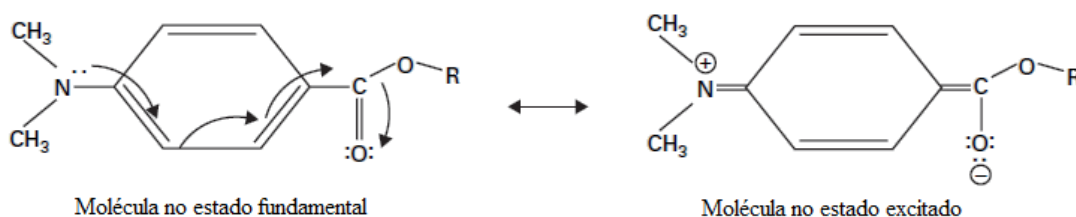


Figura I.15. Molécula do PABA: transferência de elétron do grupo doador (=NH₂) para o grupo receptor (=COOH) sob RUV (adaptado de MAIER e KORTING, 2005).

I.2.7.2 Filtros inorgânicos

Os filtros solares inorgânicos são compostos minerais, representados principalmente pelo TiO₂ e ZnO e, desempenham função protetora majoritária frente à radiação UVA (FORESTIER, 2008; BALOGH et al., 2011).

A proteção proporcionada pelos dos filtros inorgânicos, diferente daquela apresentada pelas moléculas orgânicas, baseia-se em mecanismos físicos de reflexão e dispersão, que envolvem rearranjos moleculares (alterações no tamanho e forma da molécula), sem sofrer quaisquer efeitos em sua estrutura interna (MORE, 2007). Sendo assim, formam uma espécie de barreira opaca sobre a pele, impedindo que a luz UV atinja a superfície cutânea (BALOGH et al., 2011). Apresentam relativa estabilidade, são considerados atóxicos e clinicamente seguros quando incorporados à formulações fotoprotetoras em sua forma revestida com sílica, alumina ou outro material inerte. Por essa razão, protetores solares à base de filtros inorgânicos constituem a primeira escolha para crianças e pacientes com histórico de alergias (FLOR, DAVLOS, CORREA, 2007; BALOGH et al., 2011).

I.2.8 Determinação da eficácia fotoprotetora *in vivo*

Os fotoprotetores atualmente disponíveis no mercado são, em sua maioria, formulados a partir de uma combinação racional de filtros solares orgânicos e inorgânicos, o que resulta numa maior eficácia destes produtos, uma vez que tal mistura apresenta efeito sinérgico, proporcionando um alto FPS, bem como um amplo espectro de absorção em ambas as regiões UVB e UVA, propriedades dificilmente alcançadas com o emprego de apenas um tipo de filtro (LADEMANN et al., 2005; SERPONE, DONDI, ALBINI, 2007; EL-BOURY, 2007, LATHA et al., 2013).

A eficácia de um protetor solar é determinada, através de ensaios *in vivo*, quantitativamente em termos de FPS, definido como a razão entre a dose mínima de radiação UV requerida para causar eritema em pele protegida (DME), e a dose mínima necessária para causar o mesmo efeito em pele desprotegida (FDA, 1978; FORTANIER, MOYAL, SEITE, 2012). Para isto, emprega-se a seguinte equação matemática (Equação I.1):

Equação I.1:

$$FPS = \frac{DME \text{ (pele protegida)}}{DME \text{ (pele não protegida)}}$$

No Brasil, a ANVISA, por meio da RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002; preconiza, para análise do FPS, a adoção de ensaios *in vivo* fundamentados nos testes empregados pela FDA e COLIPA, testando um grupo de, no mínimo, 20 indivíduos humanos saudáveis pertencentes aos fototipos I, II ou III de acordo com a classificação de Fitzpatrick (Quadro I.1), baseado na premissa de que esses tipos de pele são mais propensos a queimaduras solares (BRASIL, 2002).

Quadro I.1 - Classificação Fitzpatrick dos fototipos de pele

Fototipos	Características	Sensibilidade ao Sol
I - Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II - Branca	Queima com facilidade, bronzeia pouco	Sensível
III - Morena clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV - Morena moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V - Morena escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI - Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Resistente

Nesse sentido, a análise do FPS é útil para determinação da eficácia fotoprotetora frente à região UVB do espectro eletromagnético, uma vez que esta é a principal responsável por produzir eritema. Portanto, de acordo com este ensaio, um produto fotoprotetor pode ser considerado eficaz se o mesmo evitar o surgimento de queimaduras.

A avaliação do FPS *in vivo* possui várias desvantagens. Primeiramente é um método dispendioso e demorado. Além disso, levanta sérias questões de cunho ético em relação ao potencial dano à pele dos voluntários (PELIZZO, 2012).

Para avaliação da proteção contra radiação UVA, são empregadas, principalmente, duas metodologias bastante similares fundamentadas na resposta pigmentaria da pele, a IPD e a PPD. Ambas são técnicas *in vivo*, análogas ao ensaio de FPS, que expõe voluntários à radiação UVA e quantificam o grau de pigmentação cutânea ao invés do eritema. A primeira determina a menor dose de luz UVA requerida para produzir o escurecimento reversível da pele, observada imediatamente após a exposição. A PPD baseia-se na pigmentação persistente, a qual é avaliada dentro de 2 a 4h a partir da incidência de radiação (MOYAL, CHARDON, KOLLIAS, 2000; PELLIZZO et al., 2012; SKLAR, 2013).

I.2.9 Avaliação de protetores solares *in vitro*

Até o presente momento, nenhum método *in vitro* é indicado como padrão pelas agências reguladoras nacionais e internacionais para determinação do FPS, pois são considerados inadequados para tal finalidade por serem incapazes de mimetizar certas interações do produto com a pele, que podem influenciar o FPS. Além disso, nenhum dos métodos desenvolvidos apresenta correlação 1:1 com medidas *in vivo* (RUVOLO; KOLLIAS; COLE, 2014). A despeito disso, uma breve busca em bases de dados revela um grande esforço por parte de grupos científicos do mundo todo em superar este desafio.

De maneira geral, os métodos *in vitro* descritos na literatura dividem-se em duas categorias, ambas baseadas em análises espectrofotométricas: (i) medida de absorção/transmissão da RUV através de filmes de protetores solares aplicados sobre diferentes substratos, e (ii) absorção dos agentes fotoprotetores em soluções diluídas.

Uma técnica célebre e bastante difundida para determinação do FPS *in vitro* foi desenvolvida por Mansur *et al.* em 1986. Nesta, uma quantidade pré-determinada do produto fotoprotetor é diluída nos solventes etanol, metanol ou isopropanol e, posteriormente, é realizada uma leitura espectrofotométrica, na faixa de 290-320 nm. O FPS é calculado através da equação de Mansur (Equação I.2). Os valores de $EE * I$ são constantes e são apresentados no quadro I.2.

Equação I.2:

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot abs(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (10).

EE = efeito eritematogênico da radiação no comprimento λ .

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ .

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da formulação em solução no comprimento de onda (λ).

Quadro I.2. Relação efeito eritematogênico (EE) vs intensidade da radiação (I) conforme o comprimento de onda (SAYRE et al., 1979; MANSUR et al. 1986).

λ (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Σ	1,0000

Uma desvantagem deste método consiste no fato de que o mesmo não pode ser empregado para avaliação de protetores solares contendo filtros inorgânicos, em função da insolubilidade destes nos solventes utilizados. Além disso, esta análise não determina o padrão de absorção na região UVA (VELASCO et al., 2011).

Uma das técnicas *in vitro* mais confiáveis da atualidade para determinação do FPS é o método de transmitância difusa (RUVOLO et al., 2014), que pode ser empregado em protetores solares contendo filtros inorgânicos por se tratarem de sistemas opacos. Neste, o fotoprotetor é aplicado sobre um substrato com área de 56 cm² que mimetiza a pele humana, a fim de se obter uma camada de 2 mg/cm² ou 2 μ L/cm². A amostra é irradiada com lâmpada de xenônio, que emite fótons de energia no intervalo espectral de 250-450 nm.

A intensidade de luz incidida sobre o fotoprotetor se dá conforme uma distribuição hemisférica apresentada na figura I.16, sendo maior na proximidade da incidência para a direção regular transmitida. A transmitância hemisférica total é medida pelo uso de uma esfera de integração, cujo interior é revestido por material branco altamente refletivo, que coleta a luz dispersada em todos os ângulos (MOYAL; REFRÉGIER; CHARDON, 2014). Como

esquemático na figura I.17, a luz de uma fonte externa (lâmpada de xenônio) é colimatada e atinge a amostra em uma incidência normal. O defletor evita a iluminação direta do detector após a dispersão da luz através da amostra, respondendo proporcionalmente à iluminação produzida na parede interna da esfera integradora.

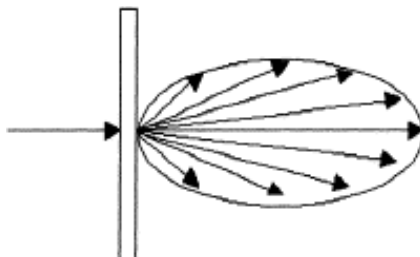


Figura I.16. Espalhamento da luz incidente sobre a amostra do fotoprotetor (SPRINGSTEEN et al., 1999).

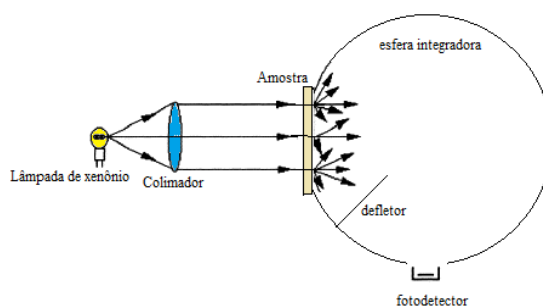


Figura I.17. Esquema de funcionamento da esfera integradora (SPRINGSTEEN et al., 1999).

Uma alta variabilidade nos resultados de ensaios *in vitro* de análise do FPS sugere que atenção especial deve ser direcionada à seleção do substrato empregado, o qual deve ser transparente, não fluorescente, fotoestável e inerte, evitando interações com o produto. Também deve apresentar propriedades óticas e físico-químicas semelhantes à pele. Embora o substrato ideal ainda não tenha sido definido, os mais utilizados são: placa rugosa de polimetacrilato (PMMA) (HEINRICH et al., 2004; GAROLI et al., 2009; HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011; RUVOLO; KOLLIAS; COLE, 2014; DIMITROVSKA et al., 2017); Transpore® (BLAESEL e ALDOUS, 2008; GAROLI, 2009; GOLMOHAMMADZADEH et al., 2011; DIMITROVSKA et al., 2017) ; Vitro-Skin® (DIFFEY et al., 2000; LOTT et al., 2003; GAROLI et al., 2009); placa de quartzo (BLAESEL, 2008; AKRMAN et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2014 FUJIKAKE et al., 2014; e teflon (PTFE) (GAROLI et al., 2008).

I.3 OBJETIVOS

Desenvolver, padronizar e validar um método *in vitro* rápido, pouco dispendioso e robusto baseado em análise espectrofotométrica, para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras durante a produção em escala industrial, utilizando como amostra padrão protetores solares disponíveis no mercado.

I.4 MATERIAL E MÉTODOS

I.4.1 Amostragem

Para desenvolvimento do método *in vitro* para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras; protetores solares comercialmente disponíveis na forma farmacêutica semi-sólida de emulsão, com os seguintes valores de FPSs descritos nas embalagens: 15, 20, 30, 40, 50 e 60; foram adquiridos de pontos comerciais regulares em Ribeirão Preto/SP, Brasil. Todos os produtos são do mesmo fabricante (A), selecionado por figurar entre as dez marcas de fotoprotetores mais consumidas no mercado nacional.

Os filtros solares presentes na composição dos produtos estão descritos na tabela I.2, a qual, revela ainda, que o fotoprotetor com FPS 40 é o único que contém em sua formulação exclusivamente filtros inorgânicos (TiO₂ e ZnO).

Tabela I.2. Composição ativa e FPSs dos protetores solares comerciais.

Componente Ativo (INCI)	Classificação		FPS Amostras					
	UVA	UVB	15	20	30	40	50	60
Ethylhexyl Salicylate*		X	X	X	X		X	X
Benzophenone-3*	X		X	X	X		X	X
Ethylhexyl Triazone*	X	X	X	X	X		X	X
Butyl Methoxydibenzoylmethane (avobenzone)*	X		X	X	X		X	X
Octocrylene*		X	X	X	X		X	X
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine*	X	X	X	X	X		X	X
Titanium Dioxide**	X	X	X	X	X	X	X	X
Zinc Oxide**	X					X		

*Filtros orgânicos; **Filtros inorgânicos

I.4.2 Caracterização qualitativa dos protetores solares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os protetores solares foram analisados qualitativamente por meio de CLAE para que a composição de filtros orgânicos descritos na embalagem fosse confirmada.

I.4.2.1 Preparo das amostras

Uma alíquota de 20 mg dos protetores solares comerciais foi dissolvida em uma mistura de solventes que consistiu em 40 mL de metanol:água (1:1, v/v) e 40 mL de diclorometano com o auxílio de banho ultrassônico durante 20 minutos. Em seguida, procedeu-se a extração líquido-líquido em funil de separação. Depois de completada a extração, as fases orgânica e aquosa foram coletadas e submetidas à análise por CLAE.

A exatidão foi validada em termos de recuperação pelo método de adição de padrão. Sendo assim, 1 mL de soluções com quantidades conhecidas de três filtros solares orgânicos: *benzophenone-3*; *avobenzone* e *octocrylene* (*Sigma-Aldrich*[®]), 2mg; 1mg e 1mg, respectivamente, foram adicionadas a 20 mg de cada protetor solar comercial. Amostras com adição de padrão, sem adição de padrão, bem como 1mL da solução padrão foram submetidas ao processo de extração descrito no parágrafo anterior. Em seguida, as frações orgânicas coletadas foram diluídas em diclorometano a uma proporção de 1:5 e analisadas em espectrofotômetro *Hitachi U2001*, na faixa de 280 a 400 nm, utilizando-se etanol para ajuste do zero. As áreas sob as curvas (ASC) obtidas foram aplicadas na Equação I.3, para o cálculo do percentual de recuperação.

Equação I.3

$$R (\%) = \frac{ascPSP - ascPSS}{ascSP} \times 100$$

Onde:

R (%) = percentual de recuperação obtido;

ascPSP = Área sob a curva dos protetores solares (PS) adicionados da mistura dos padrões de filtros (P);

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

ascSP: Área sob a curva da solução padrão de filtros solares (PF).

Tabela I.3. Condições cromatográficas (CHISVERT; TARAZONA. SALVADOR, 2013).

Fase estacionária	Coluna Hypersil C-18 Gold (250 mm L x 4,6 mm DI, granulação de 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplada a uma pré-coluna C-18 (10 mm x 4 mm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific, EUA).
Fases móveis	(A) Etanol P.A (<i>JTBaker</i> [®] , Phillipsburg, New Jersey) e (B) água acidificada com 1% de ácido fórmico (<i>JTBaker</i> [®] , Phillipsburg, New Jersey)
Vazão	0,8 mL/min
Volume de injeção da amostra	20 µL
λ de quantificação	313 nm
Tempo de corrida	0-5 min (55:45), 5-15 min (60:40), 15-20 min (80:20), 20-35 min (100: 0), 35-40 Min (80 : 20), 40-45 min (60:40), 45-50 min (55:45) e 50-51 min (STOP)
Temperatura	22°C

I.4.2.2 Perfil cromatográfico

A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema de cromatografia líquida *Shimadzu* (Kyoto, Japão), modelo LC-10 AT, acoplado a um detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador modelo C-R6A e injetor Rheodyne. Os parâmetros comatográficos, adaptados de Chisvert; Tarazona; Salvador (2013), estão descritos na tabela I.3.

I.4.3 Desenvolvimento do método espectrofotométrico *in vitro* para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras

De maneira breve, porém precisa, o design experimental proposto (figura I.18), baseia-se na absorção espectrofotométrica na região do UV (280-400 nm) de uma fina camada de protetor solar (PS) comercial, aplicada sobre a face externa de uma cubeta de quartzo preenchida com uma solução padrão (SP) que possui a capacidade de absorver fótons de energia em toda a extensão do UV, e que apresenta absorção sempre constante.

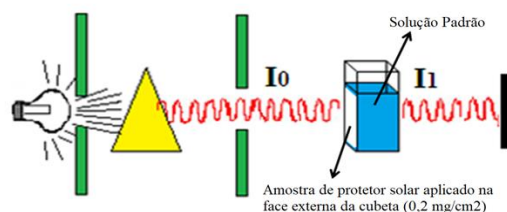


Figura I.18. Design experimental proposto.

Por conseguinte, obtém-se uma área sob a curva de absorção (ASC) da unidade experimental PS + SP. A partir do valor alcançado, é possível definir se os novos lotes de protetores solares produzidos em escala industrial mantém o mesmo padrão de absorção da RUV observado para o produto inicialmente desenvolvido, cujo FPS foi determinado *in vivo*.

A predileção pela cubeta de quartzo se exprime em razão deste material permitir uma transmissão de aproximadamente 100% da RUV, o que não é possível com o emprego de cubetas mais econômicas, de poliestireno ou vidro, por exemplo (FELS, 2017).

Uma quantidade padronizada de protetor solar ($0,2 \text{ mg/cm}^2$) foi pesada diretamente sobre uma das faces lisas da cubeta (a face que recebe o feixe de luz no espectrofotômetro) e, em seguida, foi aplicada manualmente, com dedo protegido por luva por toda a área da cubeta de maneira homogênea, empregando movimentos circulares, sem limites definidos de tempo e pressão. Após o espalhamento, as cubetas foram armazenadas em local ao abrigo da luz, a 25°C , durante 15 minutos, para secagem, de modo permitisse a formação de um filme fino.

Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio óptico (ampliação de 10 x) com o intuito de verificar o padrão de espalhamento dos fotoprotetores, garantindo assim, uma distribuição regular do produto por toda superfície definida. Em seguida, as cubetas foram preenchidas com a SP e, após 1 minuto, foi realizada a leitura da absorvância na faixa de 280 a 400 nm em espectrofotômetro *Hitachi U2001*. O valor da área sob a curva de absorção foi calculado.

I.4.3.1 Obtenção da solução padrão

Neste trabalho, foi adotada como SP uma solução de quercetina (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO) $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ em etanol 95% (*Sigma Chemical Co.* St. Louis, MO), adicionada de 6 gotas de AlCl_3 (*Merk*[®]) 6%. Essa opção é justificável, uma vez que as propriedades absorptivas da RUV pela quercetina são bem documentadas na literatura (INAL; KAHRAMAN; KÖKEN, 2001; ZHU et al., 2017).

Foram preparados 100 mL de uma solução estoque de quercetina (10 µg/mL, em etanol), bem como 50 mL de uma solução aquosa de AlCl₃. Ambas permaneceram armazenadas ao abrigo da luz, a 25°C e; diariamente, a SP (solução quercetina 10 µg/mL adicionada de 6 gotas de AlCl₃ 6% em água) foi analisada em triplicata, por espectrofotômetro (280-400 nm), durante 10 dias para avaliar a reprodutibilidade do espectro de absorção da SP. Também foi determinada a absorvância de soluções recém-preparadas em dias distintos.

A novidade da técnica proposta encontra-se na presença de uma SP, uma vez que atua como um padrão interno, como usado em técnicas cromatográficas como CLAE e CG (LOKHNAUTH; SNOW, 2005; SALGUEIRO et al., 2012). Esta SP deve ter as seguintes características: concentração constante e reprodutível e área sob a curva de absorção inter-experimentos com baixo coeficiente de variação.

I.4.4 Validação

I.4.4.1 Precisão

A precisão, definida como sendo a concordância entre os valores experimentais obtidos, ou seja, quanto mais próximos entre si estiverem, menor será a amplitude e maior a precisão, foi analisada quanto ao parâmetro intra e inter-ensaio.

I.4.4.2 Exatidão

Outro parâmetro determinado foi a exatidão. Para defini-la, realizamos uma comparação entre a resposta obtida através do método de avaliação da eficácia de protetores solares com base na irradiação de cultura celular protegida ou não por fotoprotetores, conforme descrito anteriormente por Figueiredo, 2016 (detalhado a partir do item 4.4.1), e o método espectrofotométrico aqui proposto.

I.4.4.2.1 Linhagem e cultivo celular

Fibroblastos imortalizados da linhagem L929, originados de camundongos, foram cultivados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL), incubadas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram mantidas

em crescimento com trocas do meio de cultivo a cada 2 dias. Após atingida a confluência de 80%, as células foram desagregadas usando tripsina 0,25%.

I.4.4.2.2 Determinação da eficácia fotoprotetora dos protetores solares comerciais

De acordo com metodologia já padronizada e validada em nosso laboratório (FIGUEIREDO, 2016), a linhagem celular foi semeada em microplacas de 6 poços com confluência de 8×10^5 células/poço e incubadas a 37°C com 5% CO₂. Após 12 horas, o meio foi substituído por 1,5 mL de tampão de Hank. Sobre a microplaca de 6 poços foi adaptada uma placa de quartzo (12,5 cm x 7,5 cm) demarcada por círculos de 3,5 cm de diâmetro que foram sobrepostos aos poços da microplaca. Em cada área demarcada pelo círculo, foram aplicadas homogeneamente 18 mg de amostra de protetores solares (correspondendo a 2 mg/cm²). O conjunto microplaca/placa de quartzo foi exposto à 10 J/cm² de radiação UVB em simulador solar (*Vilber Lormat*, modelo *Bio-Sun VLX – 3.W*, França) equipado com lâmpada de arco de xenônio 300 W (figura I.19). Cada amostra de protetor solar foi aplicada em triplicata. Foi realizado o controle irradiado, com a exposição das linhagens celulares à RUV sem a aplicação de fotoprotetor sobre a placa de quartzo e controle não irradiado. Após a irradiação, o parâmetro biológico de viabilidade celular foi determinado.

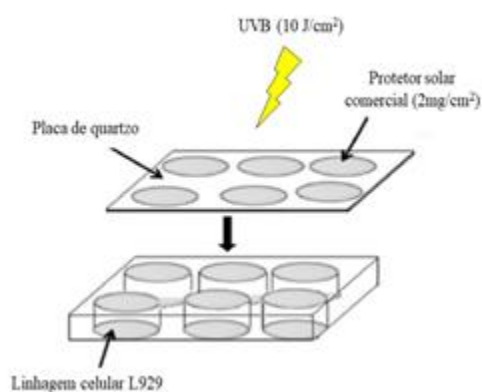


Figura I.19. Esquema do procedimento experimental para determinar a eficácia de protetores solares empregando cultura celular (FIGUEIREDO, 2016).

I.4.4.2.3 Viabilidade celular

Após a exposição da linhagem celular L929 à radiação UVB (10 J/cm²) e UVA (20 J/cm²), conforme descrito no item 4.4.2, as placas de quartzo foram retiradas e o tampão de Hank substituído por 3 mL de meio DMEM, contendo 10% de SFB. A seguir, as microplacas

foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 48h (VIELHABER et al., 2006). Após, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com solução salina (0,90% NaCl). Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução aquosa 0,01% de resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) e 1,80 mL de meio DMEM (10% SFB), resultando num volume total de 2 mL. As microplacas foram incubadas a 37°C por 4 h e, posteriormente, a fluorescência emitida foi determinada em fluorímetro de placa (*BioTek Synergy 2 - multi-mode microplate reader*, BioTek Instruments Inc., EUA) com excitação de 540 nm e emissão de 590 nm (KUETE et al., 2013). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (células não irradiada/não protegidas por fotoprotetor), considerado como 100% de viabilidade. O ensaio foi realizado em triplicata, em três dias diferentes (n=9).

I.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados usando o software estatístico *GraphPad Prism*[®] (versão 5.01, 2007) e foram expressos pela média ± erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância de ANOVA seguido por Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

I.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.6.1 Análise qualitativa da composição dos protetores solares comerciais por CLAE

O método de recuperação é o mais utilizado para validar a exatidão de um processo analítico, e é calculado como porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003).

De forma geral, a recuperação dos filtros *benzophenone-3*; *avobenzone* e *octocrylene* foi satisfatória, entre 93,05% a 101,55%, apresentando baixa dispersão e ficando entre os limites estabelecidos de 90% a 107%, recomendados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002).

Um trabalho publicado por Chisvert; Tarazona; Salvador (2013) permitiu determinar as melhores condições cromatográficas para caracterizar os filtros UV presentes nas amostras de protetores solares. O fotoprotetor com FPS 40 apresenta em sua formulação apenas filtros inorgânicos, TiO₂ e ZnO, por essa razão, este não foi analisado.

Como pode ser observado na Figura I.20, a análise qualitativa dos protetores solares comerciais por CLAE, confirmou a composição de alguns filtros orgânicos mencionados na embalagem (tabela I.3).

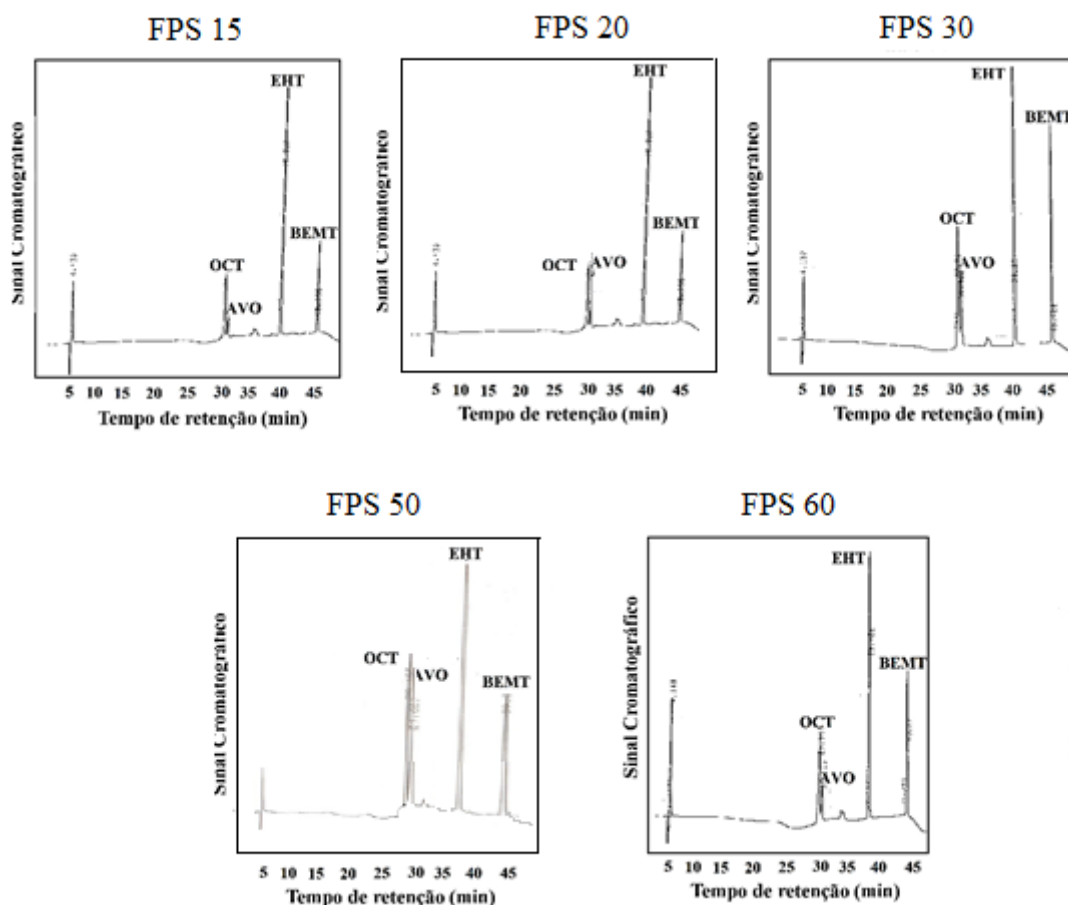


Figura I.20. Perfis cromatográficos dos filtros UV orgânicos presentes nos protetores solares comerciais da marca A com fatores de proteção solar (FPS) de 15, 20, 30, 50 e 60, obtidos da análise qualitativa por CLAE da fase orgânica (diclorometano) obtida no processo de extração (item 4.2.1). OCT = *octocrylene*; AVO = *avobenzene*; EHT: *ethylhexyl triazone* e BEMT = *Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine*.

Os filtros orgânicos foram identificados comparando os tempos de retenção obtidos para os padrões utilizados: *BEMT*; *AVO*, *OCT* e *EHT*. Nenhum pico cromatográfico foi detectado na fase aquosa da extração, o que certifica a ausência de filtros orgânicos hidrossolúveis, conforme descrito no rótulo.

Em um levantamento publicado por Godinho et al. (2017), os autores listaram os principais filtros solares presentes em formulações fotoprotetoras disponíveis comercialmente no Brasil. Entre os filtros solares orgânicos, o *BEMT* é o mais frequente, encontrado em 66,6% dos protetores solares, seguido pelo *OCT*; *ethylhexyl metoxycinamate*; *AVO* e *EHT*.

A análise da tabela I.2 e da figura I.20 indica o interesse do fabricante dos protetores solares comerciais utilizados neste estudo, em oferecer proteção de amplo espectro, empregando em suas formulações uma combinação de filtros com capacidade de proteção UVB, *EHT*, com pico máximo de absorção em 314 nm; simultaneamente UVA e UVB, como o *BEMT*, com picos de absorção em 310 e 348 nm, além da *AVO*, um filtro exclusivamente UVA (λ máx. 357 nm), associado ao *OCT*, que absove RUVB (λ máx. 303 nm), mas que é adicionado estrategicamente às formulações com o intuito de fotoestabilizar a *AVO*, uma vez que esta é facilmente degradada em presença de luz. Apenas 60 minutos de exposição à radiação UV são necessários para reduzir a efetividade deste filtro de 50% a 90% (PALM e O'DONOGHUE, 2007; BISSONETE, 2008).

I.6.2 Desenvolvimento de um método espectrofotométrico para controle de qualidade de formulações fotoprotetoras

I.6.2.1 Obtenção da solução padrão

A obtenção de uma SP capaz de absorver energia em toda a região do espectro UV (280-400 nm) é essencial para o desenvolvimento deste método, uma vez que age como um padrão interno na técnica, tendo a absorção sempre constante, com a finalidade de compensar erros aleatórios, sistemáticos e de preparo de amostra.

Em busca de uma substância pura que apresentasse absorção nos comprimentos de onda dos espectros UVB, UVA-I e UVA-II, passível de ser solubilizada em solvente que não causasse interferência nas leituras espectrofotométricas; a quercetina, um dos flavonoides mais abundantes da natureza, apresenta todas as características desejadas para a SP requerida neste método, a começar por suas propriedades absorvedoras da RUV, extensivamente discutidas na literatura (INAL; KAHRAMAN; KEN, 2001; CHOQUENET et al., 2008; ANDRADE-FILHO; RIBEIRO; NERO, 2009; SCALIA, 2010; SHIREEN; MUJEEB; MURALEEDHARAN, 2017). Tal característica foi observada, a princípio, no reino vegetal, onde algumas espécies detêm os fundamentos dos mecanismos de fotoproteção, sintetizando e acumulando compostos capazes de absorver seletivamente a RUV e dissipá-la de maneira inofensiva (STAPLETON e WALBOT, 1994; BUCHHOLZ; EHMANN; WELLMANN, 1993; MARKAN et al., 1998; WILSON et al., 2001; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; SHOURIE et al., 2014).

A capacidade fotoprotetora da quercetina advém de mecanismos antioxidantes, bem como, da absorção direta da RUV, relacionada à sua estrutura, contendo 15 átomos de carbono

em seu núcleo básico arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, com anéis benzênicos A e B ligados a um anel pirano C, possuindo o substituinte –OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4' (figura I.21) (KUMAR e PANDEY, 2013). Esta estrutura permite uma intensa absorção no UV, exibindo duas bandas: (i) 320-385 nm, representando a absorção do anel B e (ii) 250-285, correspondente à absorção do anel A (BLIER et al., 2017).

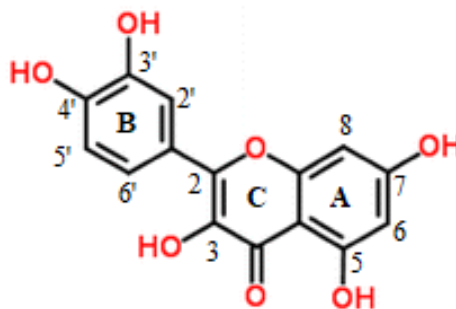


Figura I.21. Estrutura da quercetina (adaptado de VO et al., 2016).

Outra característica que corroborou para a escolha deste flavonoide como padrão, foi a estabilidade da molécula, comprovada por Fahlman e Krol (2009). Os autores demonstraram que após 11h de irradiação de uma solução metanólica de quercetina com luz UVA (740 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 365 nm) e UVB (1300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 310 nm), houve apenas uma pequena conversão (menos de 20%) em produtos de degradação do anel C (2,4,6-trihidroxibenzaldeído; ácido 2-(3',4'-dihidroxibenzoiloxi)-4,6-dihidroxibenzoico e 3,4-dihidroxifeniletanol. No entanto, a adição de um agente sensibilizador (benzofenona) à solução de quercetina, causou uma conversão induzida pela RUV superior a 90% após 1h de irradiação; sugerindo a elevada estabilidade da molécula isolada.

Igualmente, Dall'Acqua e colaboradores (2012), não observaram fotodegradação significativa ao expor solução etanólica de quercetina (2×10^{-5} M) a doses crescentes de radiação UVA e UVB (50-70 J/cm^2).

Com base nessas informações, portanto, foi preparada uma solução de quercetina em etanol na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com o intuito de empregá-la como SP. Como pode ser observado na figura I.22, a quercetina apresenta bandas características de absorção na região UV, com pico λ máx. em 370 nm, resultando em uma ASC de absorção de 27. Com o intuito de minimizar a absorção UV a um limiar que permitisse a diferenciação entre a absorção dos protetores solares aplicados à face externa da cubeta e a SP, foram adicionadas à SP 6 gotas de solução aquosa de AlCl_3 6%, formando o complexo estável quercetina- Al^{3+} (figura I.23). Esta

complexação promove desvio batocrômico, deslocando o pico de absorção para a região visível (figura I.22) (MALEŠEV e KUNTI, 2007; CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012).

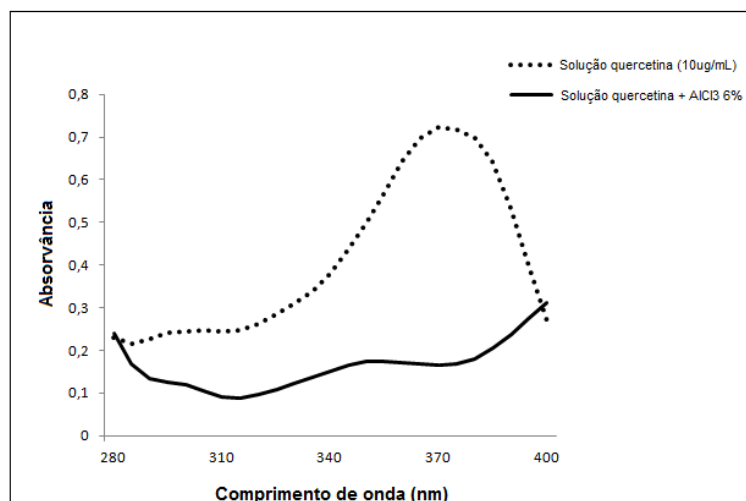


Figura I.22. Espectro de absorção da solução padrão de quercetina (10 µg/ml) (linha pontilhada) versus complexo com AlCl_3 (linha contínua).

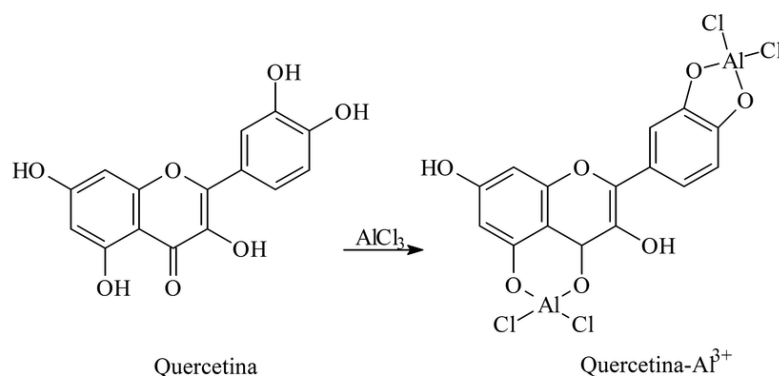


Figura I.23. Esquema ilustrando a complexação da quercetina com AlCl_3 , formando o complexo estável quercetina- Al^{3+} (adaptado de FREDERICE; FERREIRA, GEHLEN, 2010).

A figura I.24 mostra que a absorção espectrofotométrica da SP diminui à medida em que o período de armazenamento aumenta, apresentando um coeficiente de variação, em relação à ASC obtida, de 15,3%, indicando leve perda da capacidade absorvedora. No entanto, o coeficiente de variação da ASC entre soluções preparadas no mesmo dia, em três dias distintos, foi de apenas 2,7% (figura I.25).

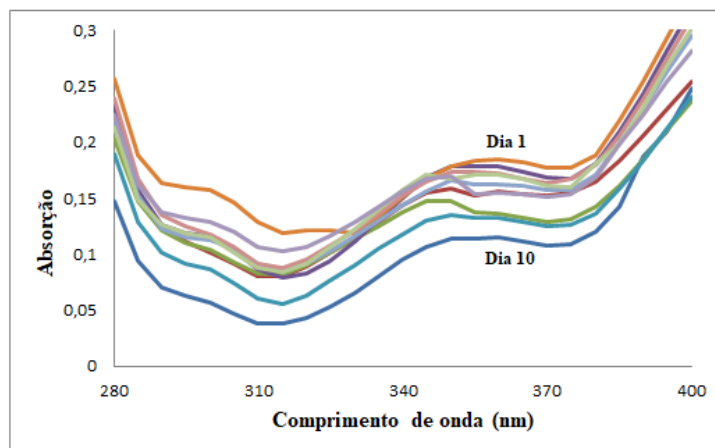


Figura I.24. Espectro de absorção da SP (quercetina 10 µg/mL em etanol, adicionada de 6 gotas de AlCl₃ 6%) analisada em 10 dias diferentes.

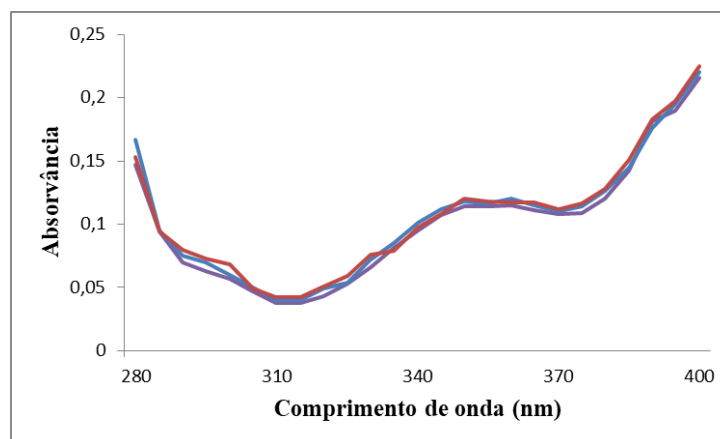


Figura I.25. Espectro da SP (quercetina 10 µg/mL em etanol, adicionada de 6 gotas de AlCl₃ 6%) preparada no mesmo dia, em três dias distintos.

Portanto, estes resultados sugerem que, apesar da estabilidade da quercetina, a SP empregada para execução do método deve ser preparada no momento da análise.

I.6.2.2 Aplicação das amostras de protetores solares comerciais

Para determinar a quantidade ideal de fotoprotetor aplicado à superfície externa da cubeta, a ASC da unidade experimental SP+PS foi determinada em triplicata para cinco concentrações diferentes do protetor solar com FPS 15: 0,2 mg/cm²; 0,5 mg/cm²; 1 mg/cm²; 1,5 mg/cm² e 2 mg/cm², apresentando uma relação linear entre a quantidade aplicada e a ASC obtida (figura I.26).

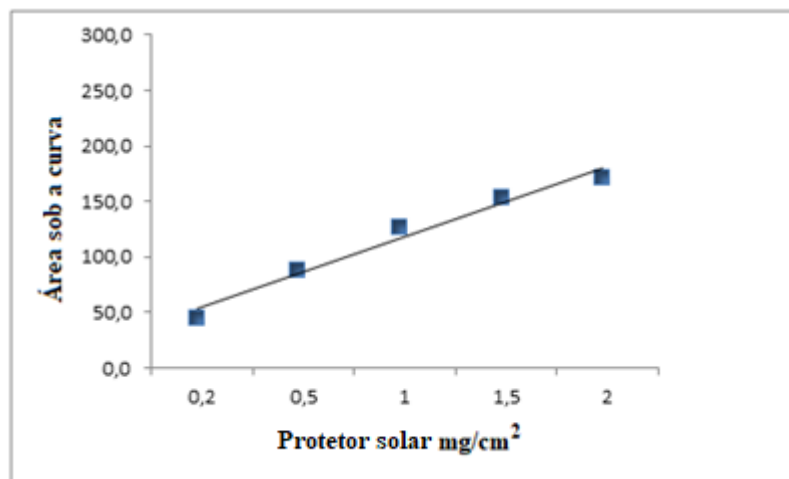


Figura I.26. Relação entre a quantidade de protetor solar (FPS 15) aplicado na face externa da cubeta de quartzo preenchida com SP e a área sob a curva de absorção obtida.

Optamos por aplicar a quantidade de $0,2 \text{ mg/cm}^2$, passível de ser pesada com exatidão em balança analítica, por apresentar uma amplitude de aproximadamente 40 entre as ASC de absorção da SP e do menor fator de proteção solar analisado (FPS 15) e permitir a formação de um filme fino e translúcido da amostra sobre a superfície da cubeta.

O padrão de aplicação da amostra é um dos parâmetros mais importantes a ser observado em testes para determinação da eficácia de protetores solares, uma vez que a absorção/transmissão é diretamente influenciada pela homogeneidade do filme formado após a aplicação do produto na superfície do substrato (GRES-BARLAG; KLETTE; WITTERN, 2004).

A Lei de *Lambert-Beer* assinala a existência de uma relação linear entre a concentração das espécies distribuídas na amostra e a absorvância medida em espectrofotômetro. Se o grau de homogeneidade de aplicação dos protetores solares é baixo, haverá regiões onde a concentração de produto será reduzida, apresentando “buracos” na área analisada, causando redução da capacidade de absorção (PETERSEN e WULF, 2014).

Para a obtenção de leituras espectrofotométricas precisas, é necessário, portanto, que a aplicação dos protetores solares na cubeta seja homogênea, assegurando uma distribuição de seus ativos de forma regular em toda a superfície. Para tanto, os protetores solares foram aplicados manualmente ($0,2 \text{ mg/cm}^2$) com dedo protegido por luva, empregando movimentos circulares, sem limite de tempo e pressão definidos. Após o espalhamento do produto, a cubeta foi pesada, assegurando que a quantidade de protetor solar remanescente corresponde à metade do valor aplicado. Esta técnica de aplicação é descrita por Fageon et al. (2009), que comparou dois protocolos distintos de espalhamento de fotoprotetores em placas de PMMA rugosas, concluindo que este procedimento apresenta resultado equivalente ao método de espalhamento

descrito no Guia Colipa para “*Determinação da Proteção UVA Fornecida por Produtos Fotoprotetores*”, que estabelece um espalhamento leve e circular, durante 30s, com pressão de 300 g/cm^2 ($0,3 \text{ atm}$).

Após a aplicação das amostras, as cubetas foram analisadas em microscópio ótico (aumento 10X) para verificar o padrão de espalhamento.

A figura I.27 A apresenta um perfil ótimo de aplicação da amostra, com as partículas distribuídas uniformemente por toda a parede da cubeta. Em contrapartida, as figuras I.27 B e I.27 C representam o tipo de aplicação indesejável, com distribuição não homogênea da amostra. Portanto, a análise microscópica da cubeta, após o espalhamento da amostra, é primordial para o sucesso do método espectrofotométrico proposto.

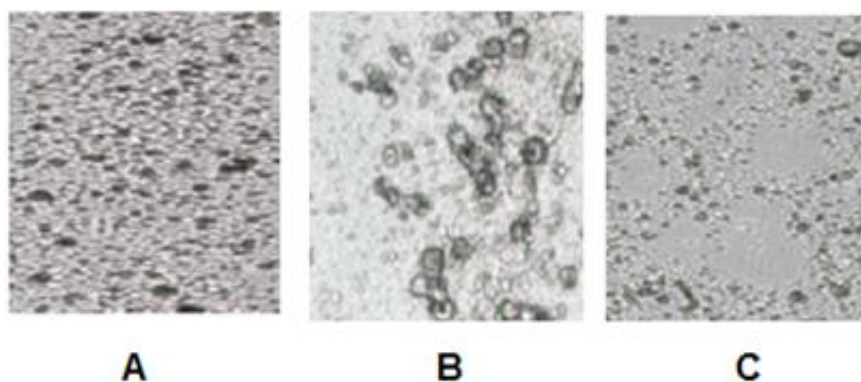


Figura I.27. Imagens microscópicas revelando os perfis de aplicação de protetores solares na face externa da cubeta de quartzo. A: perfil ótimo de aplicação. B e C: distribuição não homogênea e indesejável da amostra.

I.6.2.3 Delineamento experimental

Conforme descrito no item 4.3, foi realizada a leitura da absorvância dos protetores solares aplicados na face externa da cubeta mais solução padrão. A partir do espectro de absorvância de cada amostra, foi calculado o valor ASC. A princípio, o objetivo era construir uma curva de calibração, traçando um gráfico de \log ASC obtido vs FPS, definindo-se uma equação da reta, que seria útil para determinar o FPS de fotoprotetores produzidos em escala industrial. Inicialmente, os resultados foram plotados em um gráfico de barras (figura I.28), que indica não haver diferença estatística em relação à ASC de absorção entre os protetores solares com FPS 15 e 20 e entre os fotoprotetores com FPS 50 e 60. A partir desses dados, os valores correspondentes aos produtos com FPS 20 e 60 foram excluídos da análise.

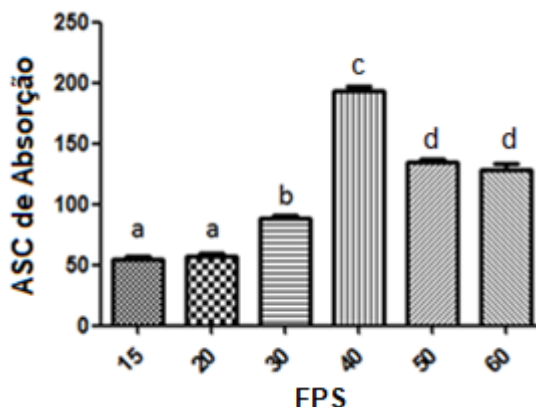


Figura I.28. Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras.

A figura I.29 apresenta a relação entre a ASC de absorvância *vs* o FPS descrito da embalagem dos protetores solares.

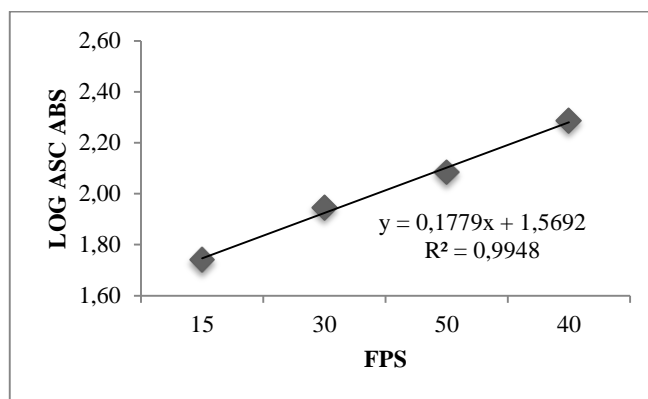


Figura I.29. Relação entre o log da ASC de absorvância versus o FPS dos protetores solares analisados.

Apesar da boa correlação encontrada ($R^2 = 0,9948$), como trata-se de protetores solares, não pode-se concluir a linearidade do experimento, posto que, em oposição ao senso comum, o nível de proteção contra os raios UV não aumenta de maneira proporcional ao FPS. Por exemplo, um FPS 30 não é duas vezes mais eficaz do que o FPS 15, uma vez que a dose de radiação UV filtrada por um protetor com FPS 15 é cerca de 93,3%; enquanto que o FPS 30 absorve em média 96,7% da radiação UVB (AUTIER, 2000; OSTERWALDER e HERZOG, 2009). Sendo assim, o que distingue os FPSs é o tempo de exposição ao Sol que estes permitem (figura I.30).

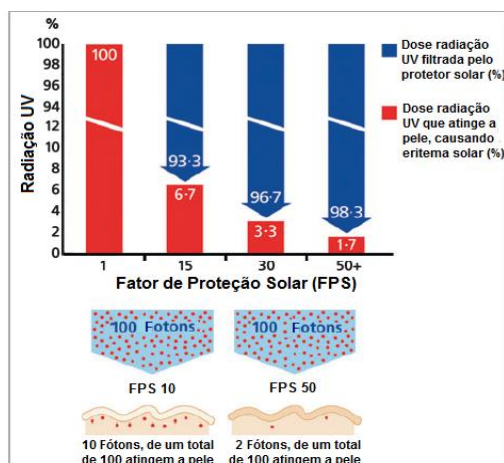


Figura I.30. Proteção proporcionada pelos protetores solares de diferentes FPSs. (Retirado e adaptado de OSTEWALDER & HERZOG, 2009).

Ademais, como podemos observar na figura I.28, o produto com FPS 40 apresentou uma ASC de absorção superior aos fotoprotetores com FPSs 50 e 60, sendo deslocado no eixo y para que a curva de calibração pudesse ser construída (figura I.29). Tal fato justifica-se ao analisarmos a composição do protetor solar com FPS 40 (tabela I.3), que contém apenas filtros inorgânicos (TiO_2 e ZnO). Estes exibem uma gama de atividade espectral mais ampla do que os filtros orgânicos, podendo refletir, dispersar e/ou absorver a RUV (MAIER e KORTING, 2005). Frente a essas dificuldades, optamos por trabalhar apenas com o valor da ASC.

I.6.2.3.1 Precisão

A precisão do método analítico determina o grau de concordância entre resultados de várias medidas independentes em torno de um valor central; ou seja, quanto mais próximos entre si estiverem, menor será a amplitude e maior será a precisão (WESTGARD e LOTT, 1981). Pode ser classificada em três níveis: (i) repetibilidade; (ii) precisão intermediária e (iii) reprodutibilidade. Para a validação do método proposto, foram avaliados os parâmetros de repetibilidade (intra ensaio) e precisão intermediária (inter ensaio). Os dados estão apresentados na tabela I.4, cujos valores obtidos encontram-se entre 1,6 e 4,4% para os ensaios de repetibilidade e entre 3,4 e 4,7% na precisão intermediária, e estão de acordo com as especificações da Anvisa, que recomenda que os resultados da precisão não ultrapassem 5% (BRASIL, 2003).

Tabela I.4. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores.

FPS Amostra	N	Repetibilidade			Intermediária		
		Média ASC	DP	DPR (%)	Média ASC	DP	DPR (%)
15	9	56,0	2,5	4,4	53,9	2,2	4,2
20	9	58,2	1,9	3,4	57,0	2,2	3,8
30	9	82,2	3,3	4,0	88,1	4,2	4,6
40	9	185,7	3,0	1,6	193,3	6,6	3,4
50	9	136,7	2,6	1,9	134,0	5,7	4,3
60	9	121,4	5,2	4,3	128,7	6,1	4,7

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Um fator importante capaz de influenciar a precisão do método *in vitro* é a natureza do substrato utilizado. Os principais materiais descritos na literatura, apesar de cumprirem algumas exigências, como: não apresentar fluorescência, ser fotoestável, inerte e permitir o espalhamento do fotoprotetor de maneira homogênea; apresentam ao menos uma limitação que resulta em obstáculo para obter valores de FPS reprodutíveis (FERRERO et al, 2002).

A fita transpore[®], por exemplo, é o material mais barato disponível, no entanto, sua qualidade pode se alterar lote a lote, causando uma importante variação entre os valores de FPS obtidos (MUTHUMANI; SUDHAHAR; MUKHOPADHYAY, 2015).

Um produto interessante que tem sido empregado é a pele sintética *Vitro Skin*[®]. Este requer uma preparação bastante demorada, e os resultados dependem do grau de hidratação do substrato, que tem uma vida útil relativamente curta, podendo interferir na reprodutibilidade das medidas (FAGEON et al., 2009; PELIZZO et al., 2012; SOHN et al. 2017).

O substrato mais amplamente utilizado, a placa rugosa de PMMA, demonstra ser o mais vantajoso: possui baixo custo e é de fácil manuseio. Contudo, o padrão de rugosidade da placa pode variar, resultando em uma discrepância dos valores medidos (FERRERO; PISSAVINI; DOUCET, 2010).

Os valores de CV obtidos para o método proposto neste trabalho demonstram-se acima das expectativas quando comparados a resultados publicados por outros autores. Qu et al (2016) desenvolveram um método *in vitro* para determinação do FPS de protetores solares comerciais baseado na dosagem cumulativa de RUV usando o filme radiocrômico *Gafchromic* modelo EBT3, resultando em uma correlação entre o valor de FPS obtido *in vitro* e o FPS descrito nas embalagens. Apesar de o método sugerido pelos autores apresentar dados mais precisos quando comparado a outras duas técnicas que empregam como substrato placa de PMMA e fita

transpore[®], os CV obtidos oscilaram de 7,14 a 10, 75%, apresentando uma variação maior do que a encontrada para o método proposto neste trabalho.

Miksa; Lutz; Guy (2014), com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade de ensaios *in vitro* para a determinação do FPS, compararam dois tipos de placas de PMMA rugosas: com e sem tratamento com jato de areia. Entre os 17 fotoprotetores comerciais analisados, o CV obtido com as placas de PMMA rugosas e tratadas com jato de areia variou entre 1,7 a 24,8%, sendo a média 9,5%. Enquanto que ao utilizar placas de PMMA não tratadas, o CV oscilou de 11,2 a 30,5%, cuja média foi de 20,6%. Os autores, portanto, conseguiram reduzir a variação entre os resultados obtidos para ensaios de FPS *in vitro*.

Em trabalho publicado por Sheu et al. (2003), o coeficiente de variação obtido em teste para determinar o FPS de formulações fotoprotetoras comerciais empregando como substrato a fita *transpore*[®], variou de 5,81 a 15,48%. Os autores consideraram baixos os valores de CV, concluindo que a técnica *in vitro* aplicada era reprodutível.

No método proposto neste trabalho, a principal variável que influencia o valor da ASC, sem dúvida, é a aplicação da amostra, uma vez que o método não sofre a limitação imposta por um substrato. Sendo assim, estabelecido o padrão de distribuição do protetor solar na superfície da cubeta, dispondo da SP, os resultados obtidos serão precisos.

I.6.3.3.2 Exatidão

Como estratégia para avaliar a exatidão do método, foi realizado um método para determinar a eficácia de protetores solares com base na irradiação de cultura celular protegida ou não por fotoprotetores, conforme descrito anteriormente por Figueiredo, (2016), tendo por objetivo mensurar a porcentagem de células viáveis (item 4.4.2.1). Os resultados estão apresentados na figura I.31 A e B.

Quando as células L929 foram irradiadas com 10 J/cm², sem a proteção dos protetores solares, observou-se aproximadamente 97% de morte celular (CI) em relação ao controle não irradiado (CNI). Nos grupos protegidos com os protetores solares, foi observada uma redução da morte celular induzida pela radiação UVB. No entanto, nota-se que não há diferença estatística na proteção fornecida pelos protetores com FPSs 15 e 20 bem como entre os produtos com FPS 50 e 60. O protetor solar com FPS 40 foi o que proporcionou maior proteção às células, 80,57% em relação ao controle irradiado (figura I.31).

Ao compararmos o gráfico plotado com os resultados de viabilidade celular e os resultados obtidos no método espectrofotométrico (figura I.32 A e B), notamos um padrão de

resposta semelhante. Ou seja, não observamos diferença estatística de absorção espectrofotométrica e de proteção contra a morte celular entre os produtos rotulados com FPS 15 e 20 e 50 e 60. Da mesma forma, destaca-se a absorção e proteção conferida pelo protetor solar com FPS 40.

O mesmo comportamento de absorção foi demonstrado quando outras marcas de protetores solares comerciais foram analisadas (marca B, figura I.33 A e B; marca C, figura I.34 A e B).

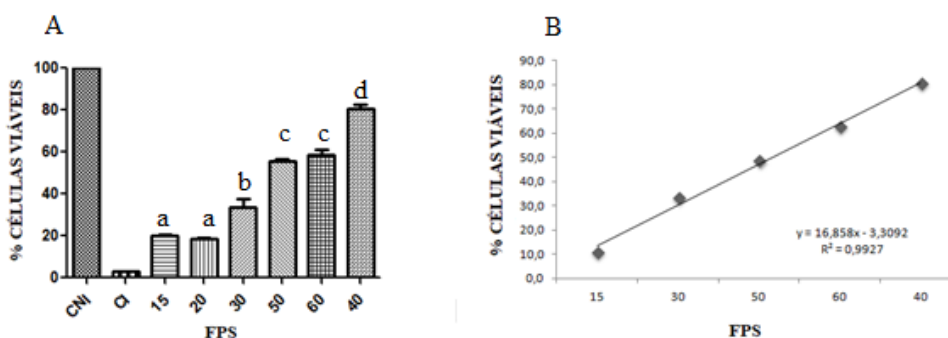


Figura I.31. (A) Medida da viabilidade celular das células L929 expostas ou não radiação UVB de 10 J/cm², protegidas ou não com os protetores solares com FPSs 15, 20, 30, 40, 50 e 60. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. Letras iguais significam ausência de diferença estatística (p<0,05), segundo teste de comparação múltipla de Bonferroni. (n=9). (B) Curva padrão obtida a partir do teste de viabilidade celular da linhagem L929 exposta à uma dose de 10J/cm² de radiação UVB, protegida por formulações fotoprotetoras com diferentes FPS aplicadas sobre uma placa de quartzo (2 mg/cm²).

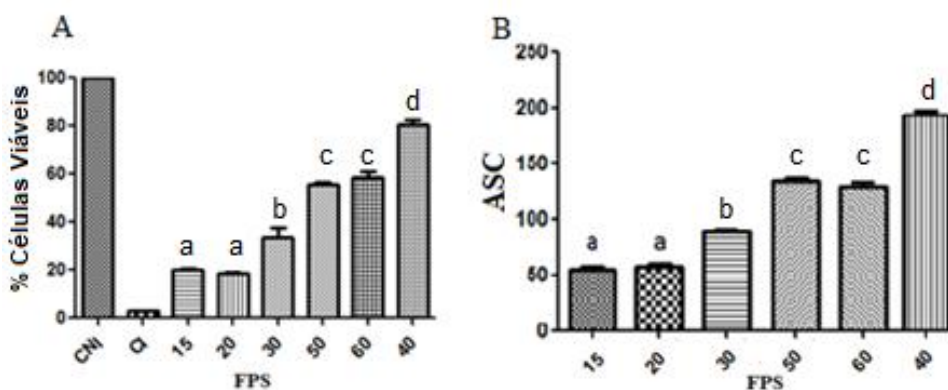


Figura I.32. (A) Medida da viabilidade celular das células L929 expostas ou não radiação UVB de 10 J/cm², protegidas ou não com os protetores solares com FPSs 15, 20, 30, 40, 50 e 60. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. **Marca A.** Letras iguais significam ausência de diferença estatística (p<0,05), segundo teste de comparação múltipla de Bonferroni. (n=9).

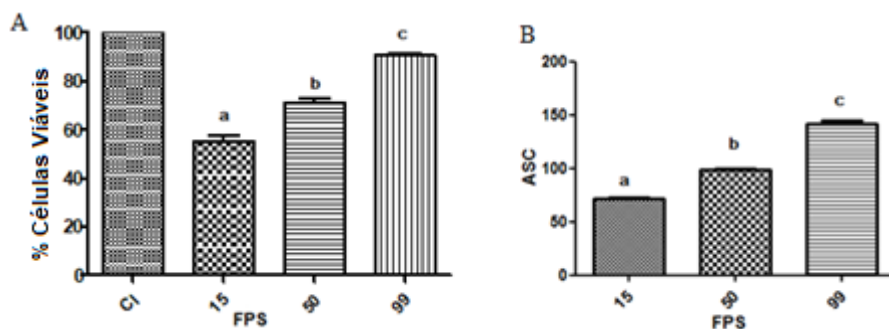


Figura I.33. (A) Medida da viabilidade celular das células L929 expostas ou não radiação UVB de 10 J/cm², protegidas ou não com os protetores solares com FPSs 15, 50 e 99. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. **Marca B.** Letras iguais significam ausência de diferença estatística ($p < 0,05$), segundo teste de comparação múltipla de Bonferroni. (n=9).

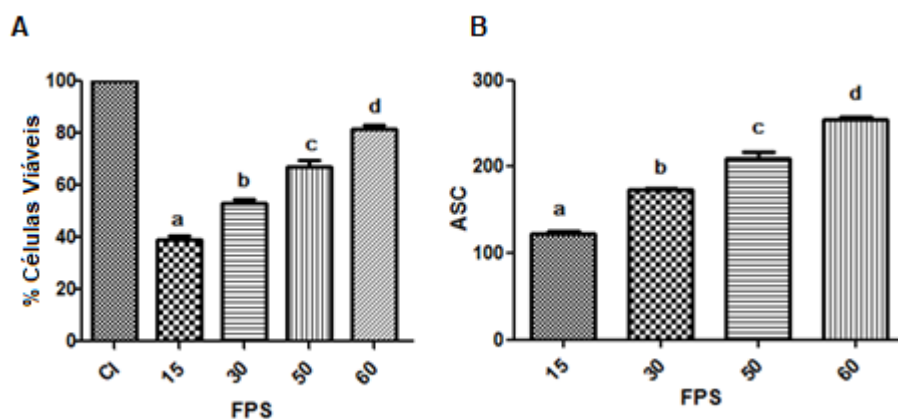


Figura I.34. (A) Medida da viabilidade celular das células L929 expostas ou não radiação UVB de 10 J/cm², protegidas ou não com os protetores solares com FPSs 15, 30, 50 e 60. CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. (B) Valores de ASC de absorção espectrofotométrica (280-400 nm) versus FPS dos produtos testados. Média de nove leituras. **Marca B.** Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$), segundo teste de comparação múltipla de Bonferroni. (n=9).

As tabelas I.5 e I.6 apresentam os valores de repetibilidade obtidos para as marcas B e C, respectivamente.

Tabela I.5. Resultados da repetibilidade do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores obtidos para a marca B.

FPS Amostras	Média ASC	DP	DPR (%)
15	71,81	1,9	2,64
50	98,2	3,4	3,5
99	141,8	4,9	3,5

Tabela I.6. Resultados da repetibilidade do método espectrofotométrico proposto para controle de qualidade de produtos fotoprotetores obtidos para a marca C.

FPS Amostra	Média ASC	DP	DPR (%)
15	122,6	4,5	3,7
30	173,6	1,7	0,98
50	210,0	9,8	4,6
60	254,6	6,1	2,4

I.7 CONCLUSÕES

Identifica-se uma oportunidade de inovação mercadológica em função do estudo e observação do mercado consumidor de produtos cosméticos e suas tendências no Brasil e no exterior e pelas dificuldades encontradas pelas indústrias cosméticas em estabelecer um método reprodutível e confiável para controle de qualidade e avaliação da eficácia de protetores solares durante a produção em escala industrial, empregando ensaios *in vitro*. A necessidade do uso de protetor solar é uma realidade indiscutível em virtude da alta incidência de doenças de pele associadas à exposição à radiação ultravioleta.

Visualizando, a incorporação de nova alternativa de avaliação da eficácia e controle de qualidade de produção de protetores solares, com consequente geração de método com caráter inovador, foi proposto um novo método espectrofotométrico baseado na aplicação de uma fina camada de protetor solar sobre a face externa de uma cubeta de quartzo preenchida com solução padrão de quercetina 10µg/mL, adicionada de AlCl₃ 6%. Baseado nos resultados obtidos, o método aqui proposto apresenta baixo coeficiente de variação, indicando boa reprodutibilidade. Este novo método tem potencial para ser utilizado na rotina industrial para controle de qualidade de protetores solares a cada novo lote produzido. Representa uma estratégia de baixo custo e complexidade.

CAPÍTULO II

*Otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes do cranberry
(*Vaccinium macrocarpon* A.)*

II.1 INTRODUÇÃO

A fotoquimioproteção, termo designado para definir o uso de agentes, especialmente antioxidantes de origem vegetal, capazes de reverter os efeitos adversos da radiação UV representa uma estratégia realista para controlar a incidência de câncer de pele (AFAQ; ELMETS, et al., 2001; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; KATIYAR, 2011; THIESEN et al., 2017), uma vez que antioxidantes sintéticos como o BHA (hidroxibutilanisol) e o BHT (hidroxibutiltolueno) possuem certa toxicidade (DJURHUUS; LILLEHAUG, 1982; LABRADOR, et al., 2007). Entre diversos compostos fotoquimioprotetores, antioxidantes fitoquímicos, pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, aparecem como alternativa promissora em razão de seus efeitos fotoprotetores, que incluem: (i) absorção direta da luz; (ii) inibição da inflamação crônica, (iii) modulação da imunossupressão, (iv) indução de apoptose, (v) atividade antioxidante direta (isto é, sequestro de EROs); e (vi) indireta (indução de respostas citoprotetoras intrínsecas) (KOSTOVA, 2008; AFAQ, 2011).

Uma das principais classes de antioxidantes naturais encontrados em plantas é representada pelos polifenóis (ATOUI, 2005; CHEW et al., 2011; GONÇALVES et al., 2017). Estes constituem uma grande família de compostos presentes na natureza, compreendendo mais de 8.000 estruturas que variam amplamente em complexidade, mas que, entretanto, compartilham uma característica em comum: a presença de pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligados. Encontram-se distribuídas em alimentos vegetais, incluindo frutas, legumes, nozes, sementes, flores e cascas (AFAQ, 2011).

Os polifenóis podem absorver todo o espectro UVB e parte do espectro UVA e UVC. Esta propriedade associada à capacidade antioxidante permite sua incorporação em formulações fotoprotetoras tópicas, contribuindo para a redução do estresse oxidativo, da inflamação e dos efeitos prejudiciais da radiação UV sobre a pele (NICHOLS; KATIYAR, 2010; GANESAN e XU, 2017).

Trabalhos na literatura demonstraram a eficácia fotoquimioprotetora de extratos vegetais e substâncias isoladas de plantas, a qual tem sido atribuída à sua capacidade antioxidante e/ou antiinflamatória. Meeran; Mantena e Katiyar (2006) verificaram em ensaios realizados com modelos animais e voluntários humanos que a aplicação tópica de antioxidantes de origem natural previamente à exposição aos raios solares UVB, pode exercer efeito protetor contra a inflamação; fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese mediada por EROs induzidas pela radiação UV.

Também foi relatado que a aplicação tópica de compostos polifenólicos pode inibir a peroxidação lipídica e evitar a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano, além de reduzir os metabólitos das prostaglandinas (PGs), particularmente a PGE2, que desempenha um papel importante na promoção de tumores (KATIYAR; PEREZ; MUKHTAR, 2000), como também podem impedir reações agudas provocadas pela radiação solar UV, diminuindo o número de células queimadas de maneira dose-dependente (ELMETS et al., 2001).

Hwang e colaboradores (2011) constataram que os flavonoides luteolina e apigenina inibiram a morte celular e a produção de EROs estimuladas pela RUVA em células da linhagem HaCat. Além disso, foi observada uma redução da produção das colagenases MMP-1, como também a supressão da expressão dos protooncogenes c-Jun e c-Fos e a fosforilação de 3 MAP quinases, que podem levar à translocação nuclear de fatores de transcrição, como o AP1, induzidas pela RUV.

Em trabalho publicado por Wolosik et al. (2017), os autores relataram que uma concentração de 0,1% de óleo de amaranto foi capaz de suprimir os danos induzidos pela RUVA, como a inibição da biossíntese do colágeno, em cultura de células de fibroblastos humanos.

Dentro da extensa gama de extratos naturais relatados por possuírem atividade antioxidante, destaca-se *cranberry* americano, uma planta nativa da América do Norte, pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium macrocarpon* A. (NETO, 2007). No Brasil, esta fruta é conhecida como: oxicoco, uva-do-monte ou mirtilo-vermelho. Os cranberries são uma fonte particularmente rica em flavonoides (aglicona quercetina e suas formas de glicosídeo), ácidos fenólicos (ácido benzoico) e polifenóis de alto peso molecular, como as proantocianidinas (PACs) (VVEDENSKAYA; VORSA, 2004).

O *cranberry* apresenta uma multiplicidade de compostos fitoquímicos que já demonstraram atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e outras propriedades preventivas do estresse oxidativo, podendo desempenhar um papel importante na quimioprevenção (NETO, 2011).

Vinson et al. (2001) demonstraram que o *cranberry*, quando comparados a outras vinte frutas, com base no peso puro, apresenta o maior teor de polifenóis, bem como de fenóis livres, resultado também encontrado por Sun et al (2002).

Wu et al. (2004) avaliaram a capacidade antioxidante total (CAT) de cem alimentos comuns. Os pesquisadores demonstraram que o *cranberry* possui a mais alta CAT quando comparados a todas as outras frutas estudadas, apresentando uma CAT de aproximadamente 95/g, sendo acompanhados pelas *blueberries* silvestres (93/g), ameixas pretas (73/g), ameixas

(62/g) e *blueberries* cultivadas (62/g). Em relação ao teor de PACs totais, o *cranberry* possui 418,8 mg/100g seguido pelas *blueberries* silvestres (331,9mg/100g), ameixas (215,9mg/100g), *blueberries* cultivadas (179,8 mg/100g) e morangos (145,0 mg/100g) (US Department of Agriculture, 2004).

Neto et al. (2006) comprovaram que as PACs encontradas em *cranberries* inibem o desenvolvimento de células tumorais *in vitro*, demonstrando que a atividade anticâncer do *cranberry* pode se originar da estrutura única tipo A de suas PACs.

Diante do crescente interesse no estudo de compostos polifenólicos como agentes fotoprotetores/fotoquimioprotetores, é necessário considerar as condições de extração destas substâncias. Muitos fatores tais como a composição do solvente, tempo de extração, temperatura, a razão planta:solvente, velocidade de agitação, pressão de extração, entre outros, podem influenciar significativamente a eficácia de extração (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005). Por essa razão, a otimização da extração de compostos fenólicos é essencial para obter um extrato rico em polifenóis.

A metodologia de superfície de resposta (MSR), originalmente descrita por Box e Wilson (1951) é uma ferramenta eficaz para otimizar esse processo, pois permite a avaliação do efeito de diversos fatores e suas interações sobre a variável resposta; cujo objetivo é a otimização dessa resposta (WETTASINGHE e SHAHIDI, 1999; FARRIS e PIERGIOVANNI, 2009).

Há trabalhos realizados para extração e determinação de compostos fenólicos do *cranberry* (CHEN; ZUO; DENG, 2001; BISWAS et al., 2012; SKROVANKOVA, et al., 2015). No entanto, ainda é inédito na literatura um estudo que determine as melhores condições de extração do *cranberry* em pó, ou trabalhos que investiguem a atividade fotoprotetora/fotoquimioprotetora deste fruto. Desta forma, este estudo tem como objetivo gerar resultados científicos sobre a otimização da extração dos compostos fenólicos do *cranberry* em pó e determinar seu potencial como agente fotoprotetor e/ou fotoquimioprotetor.

II.2 REFERENCIAL TEÓRICO

II.2.1 Estresse oxidativo

Em 1950, estudando respostas adaptativas adrenais, Hans Selye propôs o conceito de "estresse" ao identificar, em pacientes acometidos por doenças, um conjunto de sintomas em comum, traduzindo um esforço de adaptação por parte do organismo a fim de resistir a situações

que afetam seu equilíbrio interno. Tais sintomas incluíam: falta de apetite, desânimo, fadiga e hipertensão arterial.

Selye, então, conceituou estresse como: “a resposta não específica do corpo a qualquer demanda, seja ela causada por, ou resultando, em condições favoráveis ou não favoráveis”. Ele denominou esse estado de Síndrome da Adaptação Geral (SAG), a qual possui três fases distintas, identificadas hoje como (i) alarme ou alerta; (ii) resistência e, (iii) exaustão (SELYE, 1950; SZABO; TACHE; SOMOGGYI, 2012). Cerca de 20 anos mais tarde, o autor sumarizou a ideia do estresse, da resposta ao estresse e da homeostasia como sendo um equilíbrio interno dinâmico, um conceito que se tornou altamente útil para a fisiologia e patologia geral, associando o estresse ao desenvolvimento de doenças. Hoje sabemos que os processos redox são os maiores responsáveis pelas situações de estresse, culminando no surgimento de doença (BREITENBACH E ECKL, 2015).

O termo estresse oxidativo foi descrito pela primeira vez em 1970, quando a sentença “*células foram submetidas ao estresse oxidativo*” foi utilizada para relatar a adição de H_2O_2 a eritrócitos (PANIKER; SRIVASTAVA; BEUTLER, 1970). No entanto, o termo só foi conceituado em 1985, no livro intitulado “*Estresse oxidativo como um distúrbio no balanço do sistema pró-oxidante /antioxidante em favor do primeiro*” (tradução livre) (SIES, 1985).

De maneira geral, os radicais livres constituem um grupo de moléculas que contem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo, apresentando alta instabilidade e reatividade química (BIRBEN et al., 2012; SÁNCHEZ, 2017). A geração de radicais livres, majoritariamente EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), é um processo fisiológico que ocorre em todos os organismos aeróbicos e desempenha importantes funções biológicas. Quando produzidos em quantidades adequadas, agem como mediadores para a transferência de elétrons nas mais diversas reações bioquímicas, possibilitando a geração de trifosfato de adenosina através da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, porém, a produção excessiva pode causar danos ao organismo, resultado do acúmulo de lesões moleculares provocadas pela ação de radicais livres nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade e à doenças, podendo levar à morte (RAHMAN, 2007; VASCONCELOS et al., 2007; RAHAL et al., 2014; POKORSKI, 2015).

Apesar dos radicais livres existirem em abundância na natureza, aqueles que adquiriram maior importância devido à sua elevada toxicidade biológica são as EROs, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}) e o oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; KRYSTON, et al., 2011;).

Além das EROs e ERNs, existem, ainda, outros compostos altamente reativos como as derivadas de enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [M n+], que têm também um papel importante na gênese das lesões celulares e teciduais. A característica comum a todas estas espécies é a potencialidade para reagir com outros compostos gerando radicais livres. Tendo em conta esta característica, são frequentemente designadas de EROs, incluindo na mesma categoria os radicais livres de oxigênio e outras moléculas altamente reativas, sem elétrons desemparelhados, mas que são potencialmente geradoras de radicais livres (APRIOKU, 2013; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMI, 2015).

A reação de um radical livre com outra molécula produz um radical livre diferente, que pode ser mais ou menos reativo do que a espécie original. Este processo tende a repetir-se continuamente terminando, apenas, quando a extremidade radical que contém o elétron desemparelhado formar uma ligação covalente com o elétron desemparelhado de outro radical. Assim, se os radicais primários produzidos não forem desativados imediatamente por enzimas ou moléculas antioxidantes, provocam danos às macromoléculas biológicas (VASCONCELOS et al., 2007; SÁNCHEZ, 2017)

A mitocôndria constitui a fonte fisiológica majoritária de EROs. Entre os fatores exógenos, potencialmente geradores de radicais livres, destacam-se ainda os xenobióticos, metais pesados e, principalmente, RUV (figura II.1) (CADENA, 2004).

Devido à sua elevada reatividade, as EROs são capazes de modificar a maioria das moléculas biológicas. Por exemplo, a reação do radical HO^{*} com outras moléculas biológicas é altamente lesiva para a estrutura e funcionalidade celular, sendo responsável por danos nas moléculas de DNA, ao reagir com as bases purínicas e pirimídicas, por danos nas proteínas e por destruição das membranas, fruto da sua reação com os ácidos graxos insaturados, propagando uma série de reações de peroxidação lipídica, conforme discutido no capítulo I, item 2.5 (SILVA e COUTINHO, 2010; APRIOKU, 2013; VALKO, 2016).

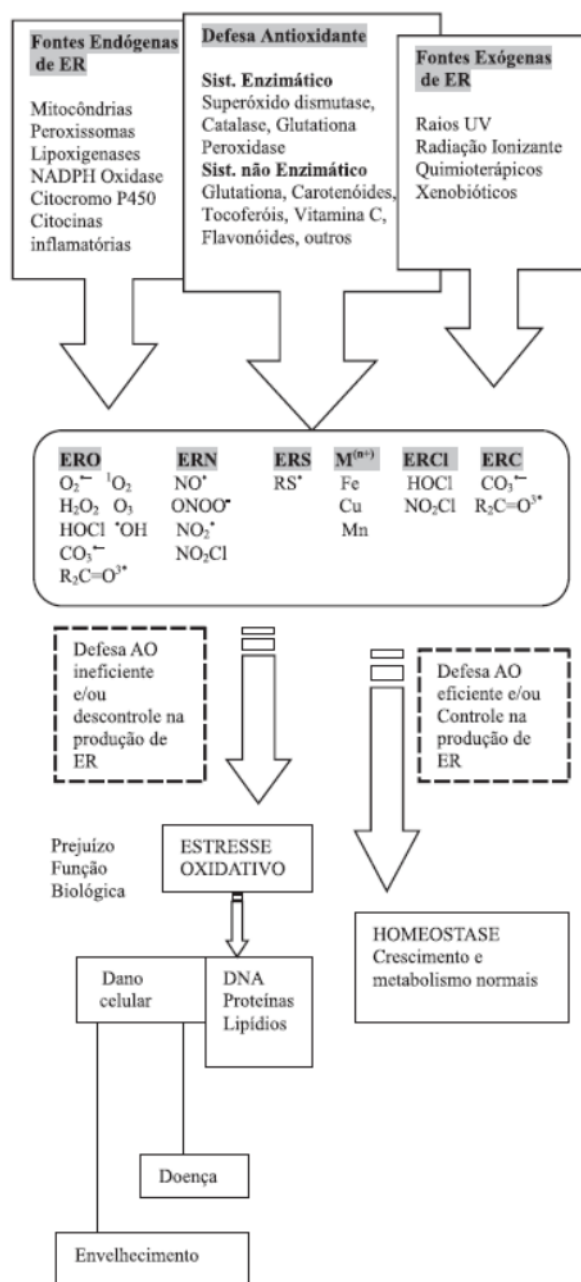


Figura II.1. Fontes e respostas celulares às EROs e ERNs, derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [(M n+)] (VASCONCELOS et al., 2007).

Embora as células possuam um mecanismo natural de defesa antioxidante para neutralizar radicais livres, o qual inclui sistemas enzimáticos e não-enzimáticos (tabela II.1), estes podem ser rapidamente esgotados, ocasionando uma alteração fisiológica no equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, culminando em um estado denominado estresse oxidativo. O desequilíbrio entre essas duas frações pode potencialmente causar danos celulares a nível molecular (KATALANIC, et al., 2006; KRYSTON et al., 2011).

Tabela II.1. Principais antioxidantes endógenos e seus efeitos (CHEN; HU; WANG, 2010; KRYSTON et al., 2011).

Antioxidantes Enzimáticos	Principais Efeitos
Superoxido Dismutase (SOD)	Converte o ânion superóxido em espécies menos reativas, H ₂ O ₂ e O ₂
Glutationa Peroxidase (GPK)	Reduz H ₂ O ₂ à H ₂ O e O ₂
Catalase (CAT)	Reduz H ₂ O ₂ à H ₂ O e O ₂
Antioxidantes Não-Enzimáticos	Principais Efeitos
α -Tocoferol (Vitamina E)	Reduz os níveis de transcrição da matriz metaloproteinase; inibe a formação de dímeros de bases nucleotídicas, retardando os processos de decomposição e mutação, protege membranas biológicas contra peroxidação lipídica
Ácido Ascórbico (Vitamina C)	Neutralização de radicais livres nos compartimentos aquosos da pele.
Carotenoides	Responsáveis pela remoção de ¹ O ₂
Glutationa Reduzida (GSH)	Promove detoxificação de H ₂ O ₂ e prevenção da peroxidação lipídica

II.2.2 Planejamento experimental e função de desejabilidade

O planejamento fatorial completo, um termo amplamente empregado em química analítica, visa melhorar o desempenho de um sistema, processo ou produto, a fim de se obter condições que produzam a melhor resposta possível. Tradicionalmente, é realizado monitorando a influência de um fator isolado sobre a resposta experimental. Enquanto apenas um parâmetro é alterado, os demais são mantidos a um nível constante (BEZERRA et al., 2008). Dessa maneira, inclui-se em cada ensaio todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores, sendo representado pela notação exponencial (x^n), onde x representa o número de níveis, e n , a quantidade de fatores. No entanto, a maior desvantagem dessa técnica consiste no fato de não considerar as interações entre as variáveis estudadas. Outro inconveniente do planejamento fatorial completo é o número de experimentos necessários para se obter a resposta, exigindo prazo mais extenso para conclusão dos mesmos, bem como, um consumo elevado de materiais e reagentes (COLLINS, et al., 2009; JAKI e VASILEIOU, 2017).

Para superar estes problemas, métodos fatoriais fracionários têm sido empregados na otimização de procedimentos analíticos. Entre estes, encontra-se a metodologia de superfície de resposta (MSR), a qual se baseia em uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas fundamentadas no ajuste de uma equação polinomial dos dados experimentais, que devem descrever o comportamento de um conjunto de respostas com o objetivo de fazer previsões

estatísticas (WANI et al., 2012). Pode ser aplicada, principalmente, quando um grande número de fatores está envolvido e a relação completa de todos os fatores que afetam as respostas é desconhecida; reduzindo o número de ensaios sem que haja perda de informações significativas para o estudo. Assim, é possível otimizar as condições de processo, maximizando rendimentos, minimizando custos, ou mesmo conduzindo o processo à obtenção de um produto com as especificações desejadas, obtendo resultados com altos índices de confiabilidade (BEZERRA et al., 2008). Em planejamentos fatoriais fracionários, para verificar a reprodutibilidade do processo, é fundamental conduzir ao menos uma triplicata da condição no ponto central.

Sendo assim, diferença básica entre uma equação de superfície de resposta e a equação para um planejamento fatorial é a adição dos termos quadráticos que permitem modelar curvatura na resposta, o que as torna úteis para: (i) entender ou mapear uma região de uma superfície de resposta; (ii) encontrar os níveis de variáveis que otimizam uma resposta e (iii) selecionar as condições operacionais que atendam às especificações (BRADLEY, 2007).

Previamente à aplicação da MSR, é necessário selecionar um desenho experimental que defina quais experimentos devem ser realizados na região de estudo. Existem dois tipos principais de arranjos: o design Box-Behnken (DBB) e o arranjo central composto (ACC). O ACC pode ser um experimento fatorial composto ou fracionado, com pontos centrais, ampliados com um grupo de pontos axiais que permitem estimar curvas (figura II.2). São úteis especialmente para experimentos sequenciais (LENTH, 2009).

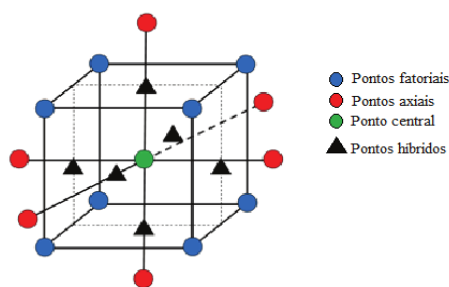


Figura II.2. Desenho experimental de um planejamento do tipo ACC.

O DBB é um projeto quadrático independente, pois não incorpora experimento fracionado ou completo (ÇORUH; ELEVLI; GEYIKÇI, 2012). Este design é caracterizado por um conjunto de pontos situados no ponto médio de cada aresta de um cubo multidimensional e com réplicas no ponto central; e requer 3 níveis de cada fator, como apresentado na figura II.3 (WANG et al., 2012).

O planejamento Box-Behnken apresenta diversas vantagens, entre elas: (i) permite identificar interações entre os fatores; (ii) determina quais fatores exercem maior influência sobre as respostas analisadas (iii) a execução de experimentos é reduzida, portanto, menos dispendiosa e (iv) possibilita uma estimativa eficiente dos coeficientes de primeira e de segunda ordem (FERREIRA et al., 2007; YU; HE, 2017). No entanto, como eles não têm um experimento fatorial incorporado, não são adequados a experimentos sequenciais.

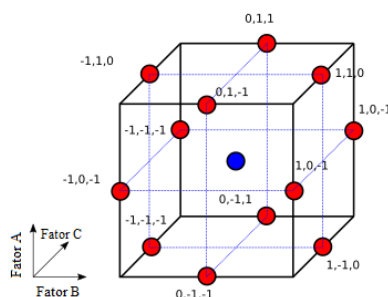


Figura II.3. Planejamento do tipo Box-Behnken e distribuição dos níveis e fatores.

Um sistema complexo que possui inúmeras respostas pode ser otimizado aplicando a técnica da função de desejabilidade; em que cada função resposta predita, y_i ($i= 1, 2...r$) é convertida em uma função de desejabilidade $d_i = h(y_i)$, $0 \leq d_i \leq 1$, que, quanto mais próxima de 1 for a função, mais desejável será a resposta (figura II.4) (CHO e PARK, 2006).

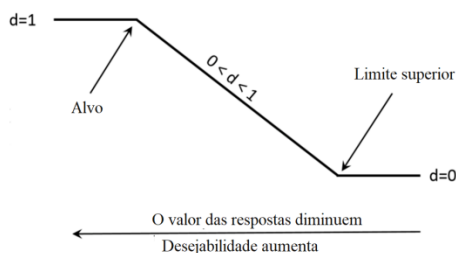


Figura II.4. Função de desejabilidade.

II.2.3 Cranberry

O *cranberry* americano é uma planta nativa da América do Norte, pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium macrocarpon* Ainton (figura II.5) (FONSECA et al., 2007).

No Brasil, esta fruta é conhecida como: oxicoco, uva-do-monte ou mirtilo-vermelho. A planta do *cranberry* é lenhosa e perene, apresentando de 15 a 25 cm de altura, com aspecto emaranhado e rasteiro, formando um “colchão” de ramos e galhos ao nível do solo. Os frutos são uma baga de cor vermelha quando maduros, com diâmetro de 1 a 2 cm. Seu interior é oco, um fator que favorece a colheita por flotação (FONSECA et al., 2007).



Figura II.5. *Vaccinium macrocarpon* A.(cranberry)

É uma fonte particularmente rica de polifenóis, associados a propriedades antibacterianas, antivirais, antimutagênicas, anticancerígenas, antitumorígenas, antiangiogênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, *in vitro* (McKAY e BLUMBERG, 2007; CÔTÉ et al., 2010; DEL RIO et al., 2013). *In vivo*, modelos animais revelam que os extratos de cranberry podem reduzir os níveis de proteína C-reativa (XIAO e SHI, 2003) e interleucinas pró-inflamatórias, além de aumentar a síntese de NO (KIM et al., 2011); inibir a enzima conversora da angiotensina, a angiotensina II e o receptor do tipo 1 da angiotensina II (YOUNG et al., 2011); bem como, suprimir infecção causada por *Helicobacter pylori* (XIAO e SHI, 2003). Ademais, melhora a capacidade de resposta das células β -pancreáticas à glicose (ZHU et al., 2012).

Estudos clínicos mostram que os polifenóis do *cranberry* podem reduzir o colesterol LDL e o colesterol total (LEE et al., 2008), elevar o índice de colesterol HDL; melhorar a função endotelial (DOHADWALA et al., 2011; FLAMMER et al., 2013), promover a capacidade antioxidante plasmática (RUEL et al., 2005; DUTHIE et al., 2006; VINSON et al., 2008) e proteger contra infecções do trato urinário (WANG et al., 2012; VASILEIOU et al., 2013).

O cranberry possui uma rica e complexa composição fitoquímica, particularmente flavan-3-ols - um tipo de proantocianidinas (PACs). Os flavan-3-ols estão presentes como

monômeros, oligômeros e polímeros. Os oligômeros e polímeros, também descritos como PACs ou taninos condensados, representam aproximadamente 85% do total de flavan-3-ols (GU et al., 2004; WHITE; HOWARD; PRIOR, 2011).

Os PACs do *cranberry* compreendem um grupo heterogêneo de estruturas químicas, caracterizadas pelas suas unidades constitutivas, tipos de ligação e grau de polimerização. A epicatequina é a unidade constitutiva predominante dos PACs, e é encontrada no *cranberry* sob ambas as formas de ligações, sendo as mais comuns do tipo A ($4\beta \rightarrow 8$ ou $2\beta \rightarrow O \rightarrow 7$) e as menos comuns, do tipo B ($4\beta \rightarrow 8$) (figura II.6). PACs com ligações do tipo A representam 51-91% do total de PACs no *cranberry* (SUN et al., 2015). A distinção entre ligações do tipo A e B é importante, uma vez que essa diferença pode influenciar as propriedades biológicas do fruto. Os PACs com ligações do tipo A exibem significativa atividade inibitória *in vitro* contra a adesão bacteriana às células epiteliais, o que não é observado para os PACs com ligações do tipo B (POLEWSKI et al., 2016). Muitos alimentos vegetais, como uva e maçã, contém quantidades elevadas de PACs, no entanto, apenas o *cranberry* apresenta grande concentração de PACs com ligações do A. Uma quantidade de 100 g de *cranberry* fruta, fornece aproximadamente 419 ± 75 mg de flavan-3-ols totais (GU et al., 2004; JUNGFER et al., 2012).

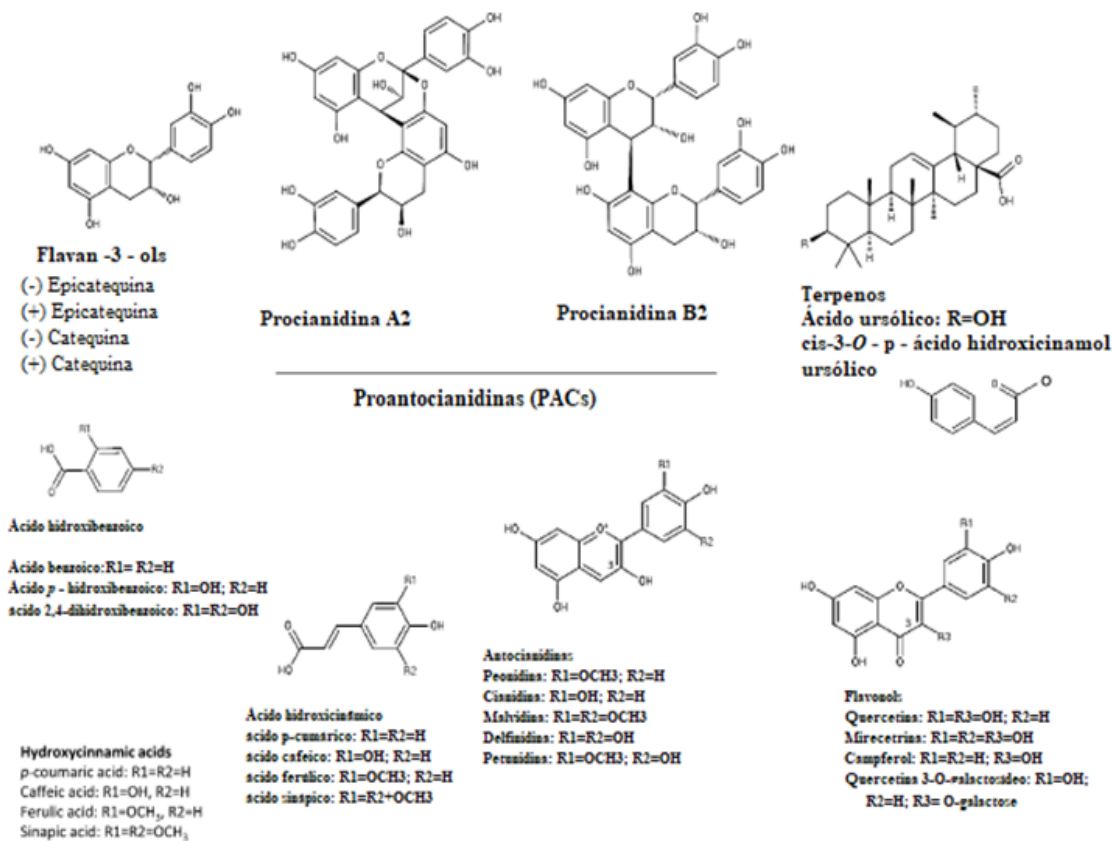


Figura II.6. Compostos bioativos do *cranberry* (adaptado de CÔTÉ et al., 2010).

Outros flavonoides presentes no *cranberry* também apresentam propriedades preventivas do estresse oxidativo e podem desempenhar um papel importante na quimioprevenção, como as antocianinas; flavonóis, ácidos benzoico e cinâmico e seus derivados e terpenos (figura II.6). Todos estes componentes podem atuar de modo complementar ou sinérgico na quimioprevenção, uma vez que já demonstraram possuir atividades antiinflamatórias e/ou antiproliferativas. Os possíveis mecanismos de ação contra a carcinogênese que estão apoiados por evidências *in vitro* incluem a indução da apoptose celular e redução metástase, como resultado as inibição das MMP, redução da expressão e atividade da ornitina descarboxilase, atividades antioxidantes que podem reduzir o estresse oxidativo e, inibição de processos inflamatórios, incluindo a atividade da COX-2 (XIAOJUN et al., 2002; MUKHERJEE; BANDYOPADHYAY; KUNDU, 2014; SKROVANKOVA et al., 2015; STEJNBORN et al., 2017).

II.2 OBJETIVOS

Otimizar os parâmetros relativos ao processo de extração do pó de *cranberry*, bem como avaliar a capacidade fotoprotetora e antioxidante *in vitro* do extrato obtido.

II.3 MATERIAL E MÉTODOS

II.3.1 Material botânico

O material vegetal seco - *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) desidratado e cominuído (tamis com abertura de malha de 100 mesh) foi adquirido da empresa Verdenutri[®]/SP.

II.3.2 Determinação do melhor solvente extrator

A primeira etapa do processo de otimização da extração dos compostos fenólicos do *cranberry* teve como objetivo determinar o melhor solvente extrator. Amostras de 10g de *cranberry* em pó foram submetidas à extração em soxhlet com quatro solventes diferentes: etanol (50% e 80%); metanol (50% e 80%); acetona (100%) e acetato de etila (100%) em tempos de 2h e 5h, perfazendo um total de 12 experimentos, conforme demonstrado na tabela II.2.

Tabela II.2. Planejamento experimental para a escolha do melhor solvente para extração.

Experimento	Solvente	Proporção	Tempo (horas)
1	Etanol	50%	2
2	Etanol	50%	5
3	Etanol	80%	2
4	Etanol	80%	5
5	Metanol	50%	2
6	Metanol	50%	5
7	Metanol	80%	2
8	Metanol	80%	5
9	Acetona	100%	2
10	Acetona	100%	5
11	Acetato de Etila	100%	2
12	Acetato de Etila	100%	5

Após a filtração a vácuo, os extratos fluidos foram avaliados pelos seguintes parâmetros: (i) medida do teor de sólidos totais (TST); (ii) teor de polifenóis totais (TPT) e, (iii) atividade redutora do radical DPPH^{*} (CI₅₀), de acordo com metodologias descritas a seguir nos itens II.3.3; II.3.4 e II.3.5.

II.3.3 Determinação do teor de sólidos totais

A determinação do teor de sólidos solúveis totais foi realizada para os extratos fluidos em balança de luz infravermelha HB43, *Mettler Toledo*[®]. Alíquotas de exatamente 1mL de cada extrato foram aplicadas sobre um suporte de alumínio previamente tarado e a massa inicial foi registrada. Em seguida, a amostra foi submetida à desidratação por luz infravermelha a uma temperatura de 105°C até que a massa ficasse constante. As análises foram realizadas em triplicata (SIQUEIRA et al., 2011).

II.3.4 Determinação do teor de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), baseado na redução do reagente FC em meio alcalino (pH 10), ajustado com Na₂CO₃ a 10%. O resultado desta redução é a formação de um complexo tungstênio-molibdênio de coloração azul com intensa absorção próxima a 760 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados

100 µL das amostras ou ácido gálico; 400 µL de água deionizada; 500 µL do reagente FC e 500 µL de solução de Na₂CO₃ (10%). Os tubos foram homogeneizados, vedados com papel filme e mantidos ao abrigo de luz durante 1 hora a 25°C. Após este período, foram realizadas as leituras das amostras e do branco (mistura todos os reagentes, exceto a amostra) a 760 nm em espectrofotômetro *Hitashi* U2001. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (SOUZA et al., 2008).

II.3.5 Determinação da atividade redutora do DPPH•

A atividade antioxidante dos extratos fluidos foi determinada pela diminuição da absorvância da solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) de acordo com o método descrito por Blois (1958). Em tubos de ensaio, foram adicionados 500 µL de tampão acetato de sódio (0,1M) pH 5,5, 500 µL de álcool etílico (95%), 25 µL de amostra e 250 µL de solução alcoólica de DPPH• (200 µM). O controle positivo não continha a amostra e o branco foi constituído de 500 µL de tampão acetato 0,1 M pH 5,5 e 750 µL de etanol. Depois de 15 minutos a leitura foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro *Hitachi* U2001. A variação da absorvância, proporcionada pelas amostras do extrato, foi comparada à absorvância do controle positivo (apenas DPPH•), que corresponde à absorvância máxima (100%).

II.3.6 Estudo de otimização do processo de extração do *cranberry* em pó por maceração dinâmica

Após a determinação do melhor solvente extrator, a otimização do processo extrativo foi conduzida empregando o método de maceração dinâmica. As condições experimentais eleitas para análise foram: (i) tempo de extração; (ii) proporção planta:solvente; (iii) temperatura e (iv) velocidade de agitação, segundo desenho experimental do tipo Box-Behnken (4 fatores e 3 níveis), totalizando 27 experimentos. A tabela II.3 apresenta os fatores escolhidos e os níveis selecionados na forma codificada: -1 (nível baixo); 0 (nível intermediário) e 1 (nível alto) e também seus valores reais. Foi realizada uma triplicata no ponto central. A escolha da melhor condição de extração foi feita através de uma ferramenta estatística de otimização, a função de desejabilidade, com o auxílio do software *Minitab*® 15 (*Lead Technologies* Inc.). Durante o planejamento, cada ensaio foi realizado de forma aleatória com o objetivo de evitar que fatores indesejáveis contaminassem os efeitos investigados.

Tabela II.3 Parâmetros avaliados no estudo de otimização de extração do cranberry em pó por maceração dinâmica.

Bloco	Tempo de extração		Proporção planta: solvente		Velocidade de agitação		Temperatura	
	Codificado	Horas	Codificado	(p/p)	Codificado	RPM	Codificado	°C
1	-1	1	-1	2	0	200	0	45
1	1	5	-1	2	0	200	0	45
1	-1	1	1	10	0	200	0	45
1	1	5	1	10	0	200	0	45
1	0	3	0	6	-1	80	-1	25
1	0	3	0	6	1	320	-1	25
1	0	3	0	6	-1	80	1	65
1	0	3	0	6	1	320	1	65
1	0	3	0	6	0	200	0	45
2	-1	1	0	6	0	200	-1	25
2	1	5	0	6	0	200	-1	25
2	-1	1	0	6	0	200	1	65
2	1	5	0	6	0	200	1	65
2	0	3	-1	2	-1	80	0	45
2	0	3	1	10	-1	80	0	45
2	0	3	-1	2	1	320	0	45
2	0	3	1	10	1	320	0	45
2	0	3	0	6	0	200	0	45
3	0	3	-1	2	0	200	-1	25
3	0	3	1	10	0	200	-1	25
3	0	3	-1	2	0	200	1	65
3	0	3	1	10	0	200	1	65
3	-1	1	0	6	-1	80	0	45
3	1	5	0	6	-1	80	0	45
3	-1	1	0	6	1	320	0	45
3	1	5	0	6	1	320	0	45
3	0	3	0	6	0	200	0	45

II.3.7 Avaliação da atividade antioxidante do extrato *in vitro*

O potencial antioxidante *in vitro* do extrato otimizado foi avaliado por métodos que simulam a formação de EROs.

II.3.7.1 Medida da atividade doadora de íons H^+ ao radical DPPH

A medida da atividade doadora de íons H^+ ao radical DPPH foi realizada conforme descrito no item II.3.5, empregando concentrações do extrato otimizado que variaram de 50 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$.

II.3.7.2 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol

A avaliação da atividade sequestradora do radical superóxido foi realizada conforme descrito por Girotti e colaboradores (2000). Em tubos de ensaio, foram adicionados 400 μL de EDTA (1 mM) em tampão glicina (0,1 M) pH 9,4; 150 μL de xantina (6 mM); 10 μL de amostra teste e 10 μL da solução de luminol (0,6 mM). A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de solução recém preparada de xantina-oxidase (20 U/mL) mantida resfriada no gelo. A medida da quimioluminescência foi realizada em luminômetro *Autolumat* LB 953 a 25°C. A porcentagem de inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida ASC, como descrito no item II.3.7.

II.3.7.3 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A determinação da inibição da peroxidação lipídica (IPL) foi realizada de acordo com HAZZIT et al. (2009), com modificações. Brevemente, foi preparada uma emulsão (10%) com gema de ovo em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Em seguida, 1 mL desse homogenato foi sonificado com 100 μL do extrato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) em metanol. A peroxidação lipídica foi induzida adicionando-se ao homogenato 100 μL de solução de sulfato de ferro (0,07 M). A reação foi realizada durante 30 minutos a 37°C. Após, 500 μL das amostras foram centrifugadas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) (15%). Posteriormente, uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi misturada com 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. A mistura foi aquecida a 95°C durante 30 minutos. Após o resfriamento, as absorvâncias foram determinadas a 532 nm em espectrofotômetro *Hitaschi* U-2001. A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi determinada comparando os resultados dos compostos testes com o controle (amostra não tratada com extrato (A0)), através da equação II.1.

II.3.8 Avaliação do extrato otimizado de *cranberry* em cultura de células

II.3.8.1 Linhagem e cultivo celular

As células de fibroblastos da linhagem L929, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL); e incubadas a 37°C com 5 % de CO₂. As células foram periodicamente subcultivadas (a cada 3-5 dias) utilizando-se tripsina 0,25 % para promover a desagregação celular.

II.3.8.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *cranberry*

As células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5 % de CO₂ e, 24 horas depois, foi realizado o tratamento com extrato dissolvido em etanol 80% nas concentrações de 4,0 µg/mL a 1000 µg/mL em meio não suplementado com SBF. Vinte e quatro horas após o tratamento, foram adicionados 180 µL de meio completo e 20 µL de solução aquosa de resazurina (*Sigma-Aldrich*, EUA) a 0,01% em cada poço, resultando num volume total de 200 µL. A microplaca foi incubada a 37°C por 4 horas. A fluorescência foi determinada em fluorímetro de placa (*BioTek Synergy 2 - multi-mode microplate reader*, *BioTek Instruments Inc.*, EUA), com excitação de 540 nm e emissão de 590 nm (KUETE et al., 2013). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

II.3.8.3 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em cultura de células

Células da linhagem L929 foram semeadas em microplacas de 6 poços a uma densidade de 8×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5 % de CO₂ e, 24 h depois, foi realizado o tratamento com extrato até uma concentração final 100 µg/mL em cada poço. Vinte e quatro horas após o tratamento, o meio de cultivo foi descartado, os poços foram lavados com solução salina 0,9 % e, foi adicionado em cada poço 2 mL de tampão de Hank. As placas foram expostas à radiação UVB (10 J/cm²) em simulador solar (*Bio-Spectra 3; Vilber Lourmat Marne-La-Vallée*, França).

Após a irradiação, as células foram desprendidas da microplaca por raspagem utilizando um suporte plástico (*cell scraper*, TPP®) obtendo-se assim, uma suspensão celular. Dessa suspensão, 900 µL foram recolhidos em *ependorfs* contendo 90 µL de BHT (2% em etanol p/v) e congelados a -20°C até a realização do experimento. O volume restante de suspensão foi armazenado para a determinação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As suspensões celulares foram descongelados e transferidos para tubos de ensaio adicionados de 1 mL de uma solução 0,375% (p/v) de TBA em 0,25 M de ácido clorídrico, contendo 15% de TCA (p/v). A mistura foi aquecida a 80°C por 15 min. e resfriada em gelo. A seguir, 2 mL de n-butanol foram acrescentados à mistura para extração do complexo MDA-TBA formado. Após agitação e centrifugação da mistura, a fase orgânica foi coletada e a leitura realizada por espectrofotometria de fluorescência, com excitação de 515 nm e emissão de 550 nm (MORLIERE et al., 1991). Os resultados foram expressos em nM MDA/*pg* de proteína e a curva padrão foi construída empregando tetraetoxipropano, que quantitativamente libera o aduto malondialdeído-ácido tiobarbitúrico nas condições do experimento. Cada determinação foi realizada em triplicata.

II.3.8.4 Avaliação da fotoestabilidade do extrato de *cranberry*

Foi preparada uma solução hidroalcoólica (80%) do extrato de *cranberry* a uma concentração de 0,5 mg/mL. Em seguida, a solução foi submetida à análise espectrofotométrica na faixa espectral de 280-400 nm para obtenção do perfil de absorção do extrato não irradiado. Posteriormente, a solução foi transferida para duas placas de petri. Uma foi exposta à RUVA e a outra, à RUVB, ambas foram irradiadas durante um período de 2h. Após, as soluções irradiadas foram analisadas novamente em espectrofotômetro. Os espectros de absorção das amostra não irradiada e irradiada com luz UVA e UVB foram comparados.

II.3.8.5 Determinação da capacidade fotoprotetora do extrato de *cranberry*

Os fibroblastos L929 foram semeados em microplacas de 6 poços com confluência de 8×10^5 células/poço e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 12 horas, as microplacas tiveram o meio substituído por 1,5 mL de tampão de Hank e foram cobertas por uma placa de quartzo, sobre as quais foram aplicadas as amostras: formulação contendo 2% do extrato otimizado de *cranberry* (tabela II.4); formulação placebo e protetor solar comercial (FPS 15) a uma concentração de 2 mg/cm² (COLIPA, 2011). O conjunto microplaca/placa de

quartzo foi exposto à radiação UVB, a uma dose de 10 J/cm². Foi realizado o controle, com a exposição das linhagens celulares à radiação UVB sem a aplicação de fotoprotetor ou formulação contendo extrato sobre a placa de quartzo (controle irradiado) (FIGUEIREDO et al., 2014). Após a exposição das células à radiação UVB, foi determinada a viabilidade celular conforme item II.3.8.2.

Tabela II.4. Composição da emulsão semi-sólida obtida.

	Componente	% (p/p)
Fase 1	Fenoxietanol	0,5
	Propilenoglicol	2,0
	Água deionizada	Q.s.p.
Fase 2	Aristoflex	2,0
	Polawax	12,0
	Álcool cetílico	5,0
	Glicerina bi destilada	2,0
	Extrato seco de cranberry	2,0

II.3.8.6 Determinação *in vitro* do FPS

Foi realizada a determinação do FPS sendo empregado o método de Mansur (1986). para o extrato otimizado e para o protetor solar da marca A com FPS 15 descrito na embalagem. Uma solução de 0,2 mg/mL do extrato e do fotoprotetor em etanol foi submetida à análise espectrofotométrica de 290 a 320 nm, com intervalo de 5 nm. O valor de FPS é calculado através da equação I.2 (capítulo I, item 2.9).

II.3.9 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística GraphPad Prism® (versão 5.01, 2007). Os resultados foram expressos pela medida \pm erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA e Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 Estudo para determinação do melhor solvente extrato do pó de *cranberry*

As extrações foram realizadas utilizando quatro solventes diferentes: etanol (50% e 80%); metanol (50% e 80%); acetona (100%) e acetato de etila (100%) com tempos de extração de 2 e 5 horas, empregando soxhlet, com o intuito de determinar o melhor solvente extrator para os compostos fenólicos do *cranberry* em pó. Os extratos fluidos obtidos desse estudo foram analisados quanto à atividade redutora do DPPH[•], expressa em termos de CI₅₀ (mg/mL); ao teor de sólidos totais (TST % p/p) e polifenóis totais (TPT mg/g de extrato), conforme apresentados na tabela II.4.

Tabela II.5 Caracterização dos extratos fluidos de *cranberry* obtidos por soxhlet.

Experimento	Solvente	Teor Solvente (% v/v)	Tempo (h)	CI ₅₀ (mg/mL)	TST (% p/p)	TPT (mg/g)
1	Etanol	50	2	0,127±0,003	4,36±0,13*	315,7±2,9*
2	Etanol	50	5	0,115±0,003*	4,5±0,16	336,1±9,9
3	Etanol	80	2	0,140±0,02	4,73±0,07	395±4,0
4	Etanol	80	5	0,120±0,013	4,68±0,14	338,6±2,8
5	Metanol	50	2	0,120±0,011	4,74±0,43	406,3±0,9**
6	Metanol	50	5	0,120±0,011	4,84±0,34	385,1±1,6
7	Metanol	80	2	0,150±0,004**	5,02±0,12**	393,8±7,3
8	Metanol	80	5	0,125±0,013	4,73±0,03	388,1±2,6
9	Ac. de etila	100	2	-	-	-
10	Ac. de etila	100	5	-	-	-
11	Acetona	100	2	-	-	-
12	Acetona	100	5	-	-	-

(**) Valores máximos e (*) valores mínimos obtidos para as respostas analisadas.

A análise da tabela II.4 evidencia que na extração contínua com soxhlet, o teor de sólidos totais variou de 4,36% ± 0,13, utilizando como solvente o etanol 50%, no tempo de extração de 2 h, a 5,02% ± 0,12, com metanol 80% e tempo de extração de 2h; não havendo diferença estatística significante entre todos os valores obtidos, sugerindo que ambos os

solventes etanol (50 e 80%) e metanol (50 e 80%) resultam em concentrações semelhantes de sólidos solúveis, independente dos tempos de extração empregados nesta etapa do estudo. Nas amostras em que se utilizou os solventes acetato de etila e acetona (solventes de menores polaridades), não foram detectados sólidos solúveis ou compostos fenólicos, não sendo possível determinar a atividade antioxidante. Estes resultados estão de acordo com outros autores que sugerem que solventes com alta polaridade, como a água, e solventes com polaridade muito baixas, ou apolares, como hexano ou diclorometano, não são bons extratores (LIU et al., 2000).

Estudos prévios demonstram uma possível correlação entre o teor de polifenóis totais e propriedades antioxidantes de extratos vegetais, destacando a importância desta análise (ZUJKO, 2005; IVANOVA, 2005; KISELOVA et al., 2006; ALMAJANO, 2008; MURILLO; BRITTON; DURANT, 2012; GONÇALVES et al., 2017). O teor de polifenóis totais foi determinado através da equação obtida pela curva padrão de ácido gálico: $y=0,0063x - 0,0023$ ($r=0,999$), onde x representa a concentração de polifenóis e y , a absorvância obtida. O teor de polifenóis variou de $315,7 \pm 2,9$ mg/g para o solvente etanol 50% com 2h de extração, a $406,3 \pm 0,9$ mg/g, com metanol 50% e 2h de extração, havendo diferença significativa entre os valores obtidos. No entanto, foi observado que não há diferença significativa entre solventes com a mesma proporção de água e tempos de extração distintos (etanol 50% com 2 e 5h de extração; etanol 80% 2 e 5h de extração; metanol 50% 2 e 5h de extração; metanol 80% 2 e 5h de extração), indicando que o tempo de extração empregado nestes testes não influenciou na concentração de compostos fenólicos nos extratos fluidos obtidos. Ressalta-se também que a extração com etanol a 80% (2 e 5h) não apresentou diferença significativa em relação ao valor máximo de polifenóis obtidos com o solvente metanol 50% (2 ou 5h). A redução da proporção de água no etanol de 50% para 20%, proporcionou um meio moderadamente polar, contribuindo para a extração de compostos fenólicos em nível semelhante ao metanol 50%, uma vez que a polaridade do solvente exerce grande influência na qualidade da extração, devendo este ser o mais seletivo possível (MIGLIATO et al., 2011).

A atividade antioxidante dos extratos fluidos obtidos foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH[•], expressa em CI₅₀. Na tabela II.3 nota-se que os solventes empregados (exceto acetato de etila e acetona) e os tempos de extração não afetaram a atividade antioxidante, que variou de $0,115 \pm 0,03$ mg/mL (etanol 50%, 2h de extração) a $0,150 \pm 0,04$ mg/mL (metanol 80% 5h de extração), não sendo observada diferença significativa entre todos os valores de CI₅₀ obtidos.

Com base nos dados obtidos nesta primeira etapa do processo de otimização da extração do *cranberry*, evidenciando que não houve diferença significativa entre os solventes metanol (50% e 80%) e etanol (50% e 80%) quanto à análise de sólidos totais e atividade antioxidante (CI₅₀) e, em relação ao teor de polifenóis totais os solventes metanol 50% e etanol 80% resultaram em concentrações estatisticamente semelhantes entre si; o solvente etanol 80% foi selecionado para a próxima fase do estudo de otimização das condições de extração do *cranberry* em razão de seu baixo potencial tóxico quando comparado ao metanol, classificados pela Farmacopeia Americana (USP) em relação ao grau de risco tóxico em classe 3 e classe 2, respectivamente (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

II.4.2 Estudo de otimização do processo de extração do *cranberry* em pó por maceração dinâmica

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica matemática e estatística, que pode ser usada para estudar e otimizar sistemas multivariáveis, pois permite encontrar a verdadeira relação entre a resposta e o conjunto de variáveis independentes (MAJEED, 2015).

Neste estudo quatro variáveis operacionais: (i) tempo de extração; (ii) proporção planta: solvente; (iii) temperatura e (iv) velocidade de agitação em três níveis (baixo, médio e alto), foram otimizadas para obter o máximo rendimento do extrato e a maior atividade antioxidante usando MRS e empregando etanol 80% como solvente extrator. A tabela II.5 apresenta os resultados obtidos a partir da análise dos extratos fluidos quanto à atividade redutora do DPPH*, expressada em termos de CI₅₀ (mg/mL); ao teor de sólidos totais (TST % p/p) e polifenóis totais (TPT mg/g de extrato).

Tabela II.6 Teor de polifenóis totais, sólidos totais e CI₅₀ dos diferentes extratos fluidos de *cranberry* obtidos.

Experimento	Fatores				Respostas		
	Tempo (h)	Proporção planta:solvente (p/p)	Velocidade de agitação (RPM)	Temperatura (°C)	TPT (mg/g)	CI50 (mg/mL)	TST (%)
1	1	2	200	45	432,2 ±0,21**	0,141	20,31±0,2
2	5	2	200	45	432,1±0,09	0,126±0,04	21,42±0,03**
3	1	10	200	45	366,8±3,91	0,110±0,03	5,01±0,1
4	5	10	200	45	388,8±2,08	0,126±0,03	5,69±0,4
5	3	6	80	25	417,9±1,58	0,159±0,1	7,34±0,2
6	3	6	320	25	424,7±0,66	0,113±0,002	7,73±0,01
7	3	6	80	65	426,1±0,45	0,101±0,015	8,26±0,3
8	3	6	300	65	424,7±1,03	0,104±0,03	8,57±0,2
9	3	6	200	45	423,8±0,93	0,145±0,018	7,93±0,04
10	1	6	200	25	424,7±0,14	0,177±0,03**	7,76±0,1
11	3	6	200	25	417,8±1,81	0,145±0,02	7,55±0,06
12	1	6	200	65	425,3±1,61	0,172±0,02	7,82±0,5
13	5	6	200	65	413±1,44	0,122±0,024	8,02±0,1
14	3	2	80	45	429,2±2,82	0,111±0,021	19±0,3
15	3	10	80	45	337,1±10,8	0,113±0,016	5,24±0,1
16	3	2	300	45	429±0,05	0,148±0,035	19,53±0,02
17	3	10	300	45	309,8±8,19	0,073±0,013*	4,77±0,01*
18	3	6	200	45	412,1±4,63	0,138±0,017	7,7±0,4
19	3	2	200	25	429±0,14	0,181±0,05	18,96±0,2
20	3	10	200	25	266,8±4,5*	0,112±0,01	4,92±0,03
21	3	2	200	65	427,9±0,47	0,162±0,035	20,72±0,05
22	3	10	200	65	304,6±14,2	0,103±0,02	4,98±0,4
23	1	6	80	45	406,6±1,15	0,163±0,03	7,98±0,4
24	5	6	80	45	412±0,71	0,104±0,02	8,13±0,2
25	1	6	300	45	396,1±3,77	0,135±0,016	7,96±0,01
26	3	6	300	45	382,6±14,7	0,122±0,03	7,76±0,65
27	3	6	200	45	419,5±3,28	0,141±0,02	7,79±0,1

(**) Valores máximos e (*) valores mínimos obtidos para as respostas analisada

A análise da tabela II.6 mostra que o TPT foi influenciado pela proporção planta:solvente (S/D), graficamente demonstrado na figura II.7 A e II.7 B, sugerindo que quanto menor a proporção de planta:solvente, maior será o TPT.

Tabela II.7. Fatores significativos ($p \leq 0,05$) que influenciam o processo de extração de acordo com os parâmetros (respostas) analisados.

Extração por Maceração	
Respostas	Fatores $p \leq 0,05$
TPT	S/D: $p = 0,019$
CI ₅₀	S/D: $p=0,007$ /ATEMP: $p=0,05$
TST	S/D: $p=0,000$ /AT: $p= 0,039$

S/D: proporção planta:solvente; ATEMP: temperatura (°C); AT: tempo de extração (h)

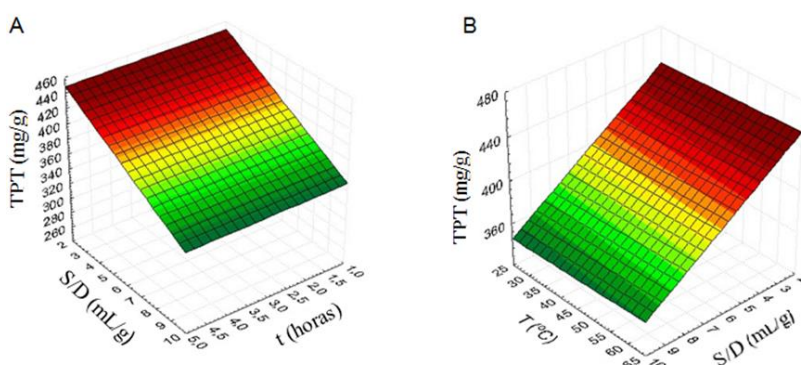


Figura II.7. Superfície de resposta para o teor de polifenóis totais (TPT) em função da (A) proporção planta:solvente (S/D) e tempo e (B) temperatura e S/D.

A CI₅₀ foi influenciada pela proporção planta:solvente e temperatura (tabela II.5, figura II.8). Analisando a figura II.8 A, os menores valores para o CI₅₀ são obtidos quando, simultaneamente a proporção planta:solvente e temperatura são aumentadas. A Figura II.8 B mostra o efeito da contribuição do tempo e da proporção planta:solvente e suas interações no teor de sólidos totais.

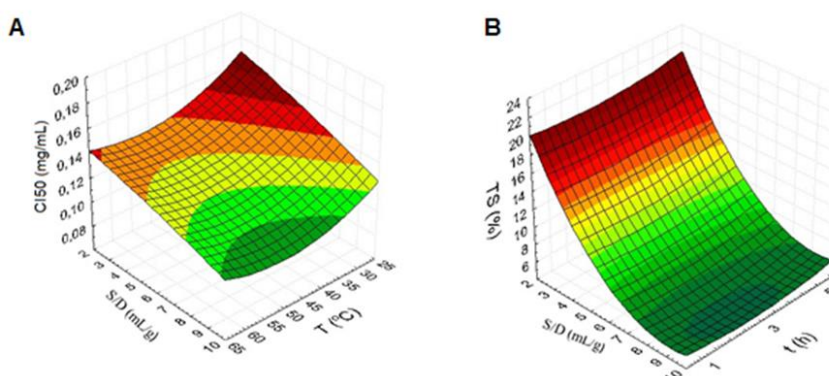


Figura II.8. Superfície de resposta para a CI₅₀ em função da (A) proporção planta:solvente (S/D) e temperatura, e (B) teor de sólidos totais em função do S/D e tempo.

Neste estudo, o objetivo da otimização foi encontrar as condições que resultem no máximo teor de polifenóis e sólidos totais e em mínima CI₅₀ para o processo de extração do pó de cranberry

por maceração dinâmica. O software gerou ótimo tempo de extração, proporção planta:solvente, velocidade de agitação e temperatura como sendo 5 h, 1:2, 80 RPM e 45°C, respectivamente. Experimentos em triplicata foram realizados sob as condições otimizadas e os resultados foram comparados com os valores preditos, sendo similares, conforme apresentado na tabela II.7.

Tabela II.8. Comparação entre os valores preditos e experimentais para as condições ótimas determinadas.

Condições ótimas para maceração			
Tempo (h)	S/D (p/p)	Vel. agit. (RPM)	Temperatura (°C)
5	1:2	80	45
Função de Desejabilidade			
	TPT (mg/g)	CI ₅₀ (mg/mL)	TST (%)
Valor predito	433,08	0,100	19,87
Valor experimental	418,3±1,78	0,109±0,006	21,8±1,09

II.4.3 Avaliação da atividade antioxidante do extrato *in vitro*

II.4.3.1 Medida da atividade doadora de íons H⁺ ao radical DPPH

O DPPH[•], (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), é caracterizado como um radical estável (figura II.9 A), com pico de absorção em 517 nm. Em presença de substâncias antioxidantes, a molécula de DPPH[•] é convertida em sua forma reduzida, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (figura II.9 B), com perda da coloração violeta característica e aparecimento de uma cor residual amarela devido à presença do grupo picril, indicando o potencial antioxidante da substância testada (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004). Um parâmetro bastante utilizado para a interpretação dos resultados obtidos é a CI₅₀, definida como a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade de DPPH[•] (coloração). (BLOIS, 1958).

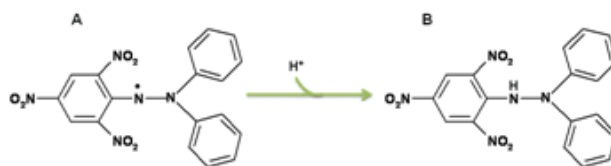


Figura II.9. (A) radical difenilpicrilhidrazila e (B) molécula difenilpicrilhidrazina.

No presente estudo, o potencial antioxidante do extrato otimizado de cranberry em diferentes concentrações foi avaliado. A concentração necessária para reduzir a atividade inicial

do DPPH• em 50% (CI₅₀) sob condições experimentais específicas foi calculado e, o resultado é apresentado na figura II.10. O extrato de cranberry otimizado reduziu o DPPH• de maneira concentração-dependente, com valor de CI₅₀ de 136,7 ±6,8 µg/mL (corresponde a Log CI₅₀ = 2,136 µg/mL).

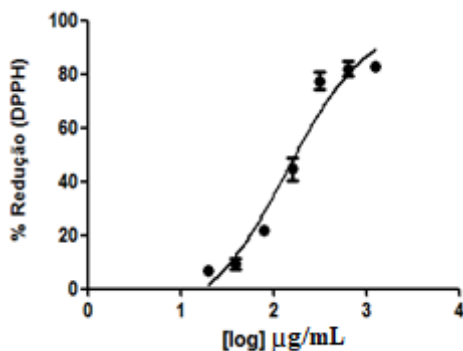


Figura II.10. Medida da atividade redutora do radical DPPH• pelo extrato de otimizado de cranberry. Resultado representa média±DP, n=9.

Huang et al. (2012) investigaram a atividade antioxidante três frutos pertencentes, assim como o cranberry, à classe das berries, também chamada de "a classe das superfrutas", considerada um fonte particularmente rica de antioxidantes naturais (VVEDENSKAYA; VORSA, 2004). Os autores encontraram, no o ensaio de DPPH•, valores de CI₅₀ de 810 µg/mL; 420 µg/mL e 440 µg/mL para o morango, *blueberry* e *blacberry*, respectivamente, sugerindo maior potencial antioxidante do extrato de *cranberry*.

A presença de flavonoides geralmente fornece alta atividade antioxidante em virtude da presença de duplas ligações existentes nos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de algumas moléculas de flavonoides, de modo que a estrutura química, posição e arranjo dos grupos hidroxila desta classe de polifenóis influenciam a atividade antioxidante. Uma alta atividade sequestradora de radicais livres é exibida por substâncias que possuem em sua estrutura a fração *orto* 3', 4'-dihidroxi no anel B (quercetina e catequina), a fração 5', 7'-dihidroxi no anel A (canferol), bem como dupla ligação entre as posições 2 e 3 combinadas com o grupo carboxílico na posição 4 do anel C (LOGANAYAKI; SIDDHURAJU; MANIAN, 2013). Dessa forma, foi previamente demonstrado que nenhuma substância isoladamente é capaz de reagir com todos os tipos de radicais livres (KONDO et al. 2000; RICE-EVANS et al. 1996), ressaltando-se assim a importância da utilização de extratos vegetais brutos, que são compostos por uma variedade de substâncias, apresentando efeito sinérgico.

Embora o método de DPPH• seja amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, não é o melhor método para a determinação de compostos antioxidantes, uma vez que o DPPH•, espécie radicalar centrada no nitrogênio, não está presente nos sistemas biológicos e a maioria dos radicais envolvidos na deterioração oxidativa são EROs (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Já os radicais peroxila e alcoxila, envolvidos na peroxidação lipídica, e o ânion superóxido, radical que tem sua presença exacerbada relacionada a alguns tipos de câncer (PIETTA, 2000), são importantes EROs geradas no processo de estresse oxidativo. Assim, os extratos também foram avaliados quanto à capacidade de inibir a peroxidação lipídica e de sequestrar EROs geradas nos sistemas xantina/XOD/luminol.

II.4.3.2 Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol

O extrato otimizado de cranberry apresentou atividade inibidora do sistema xantina/XOD/luminol de maneira dependente da concentração, variando de aproximadamente 22 a 96% (em concentrações de 0,0145 a 7,5 µg/mL no meio reacional), com CI_{50} de $0,202 \pm 0,032$ µg/mL (corresponde a Log de CI_{50} de -0,694), como demonstrado na figura II.11.

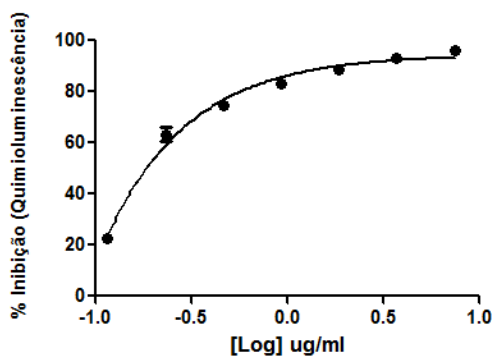


Figura II.11. Medida da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol. Os resultados representam média de três determinações \pm DP.

Dados apresentados na literatura por nosso grupo de pesquisa, empregando a mesma metodologia para o ensaio xantina/XOD/luminol, indicam um CI_{50} de 11,3 µg/mL para a quercetina, um conhecido flavonoide utilizado como composto de referência em razão de seu alto poder antioxidante (FONSECA et al., 2010). Esta evidência sugere que o extrato de cranberry possui uma elevada capacidade de sequestro do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que, neste

ensaio, é um produto da reação entre xantina e xantina oxidase (XOD) em presença de O_2 (figura II.12).

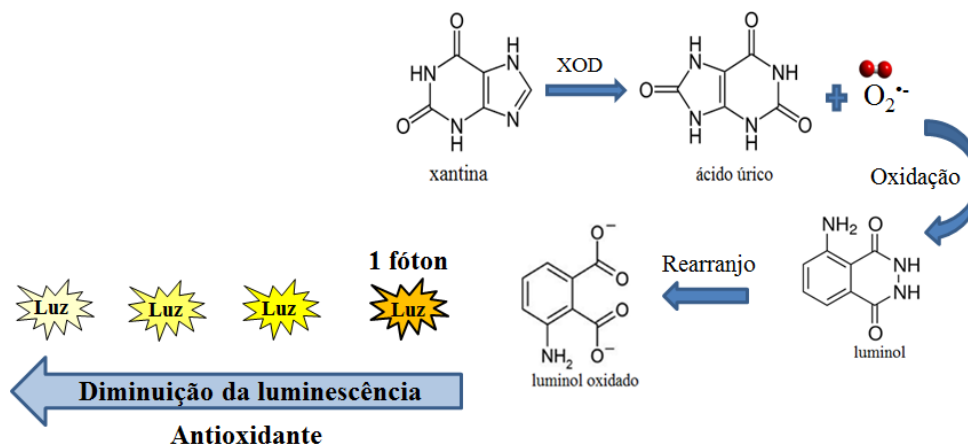


Figura II.12. Representação esquemática da reação de quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol para determinação de atividade antioxidante.

EROs são produzidas normalmente pelo organismo como produto do metabolismo no processo de respiração celular, como também são geradas pela exposição não protegida da pele à radiação UV, que fotossensibiliza cromóforos endógenos, tais como porfirinas, riboflavinas, bases nucleotídicas, aminoácidos e seus derivados (ácido urocânico, por exemplo), originando radicais livres (WONDRAK, 2005).

O ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em especial aparece como um radical livre pró-inflamatório que provoca danos às células endoteliais promovendo aumento da permeabilidade microvascular e contribui para a migração de neutrófilos para focos inflamatórios, como também desempenha papel importante na patogênese de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão e aterosclerose. O radical superóxido pode ainda ser dismutado em espécies mais agressivas como o radical hidroxila (HO^{\bullet}), formado a partir da interação do $O_2^{\bullet-}$ com íons de ferro ou cobre livres; como também pode ser combinado com óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) e produzir peroxinitrito ($ONOO^-$), alterando assim a biodisponibilidade de NO (AFONSO et al., 2007; FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

Dessa forma, o resultado apresentado com este ensaio *in vitro* fornece indícios acerca da elevada atividade do extrato de cranberry no sequestro de radicais superóxidos, sugerindo uma possível alternativa ao combate desta espécie reativa extremamente danosa para o organismo humano.

II.4.3.3 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método colorimétrico de quantificação do TBARS, um ensaio bastante empregado para determinar a peroxidação de lipídeos de membranas e em sistemas biológicos. Baseia-se na reação estequiométrica 2:1 do TBA com o MDA gerado durante a incubação do substrato lipídico com um agente indutor de peroxidação. A reação resulta em um cromóforo rosa, cuja leitura é realizada em espectrofotômetro a 532 nm (Figura II.13).

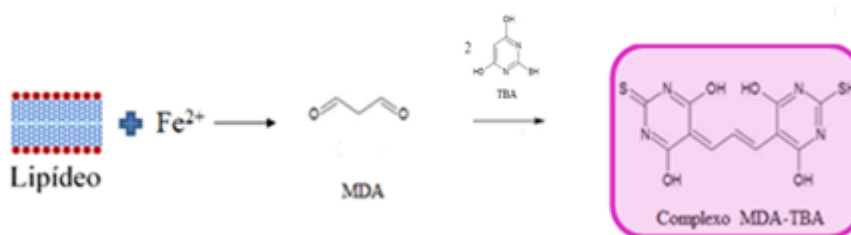


Figura II.13. Representação esquemática da indução da peroxidação lipídica in vitro.

Os resultados obtidos mostram que o extrato apresentou uma CI₅₀ de 32,6 ± 5,8 µg/mL (corresponde a Log de CI₅₀ de 1,51), como mostra a figura II.14, sugerindo que o extrato de cranberry exerceu um efeito antioxidante bastante significativo contra os radicais peroxilas induzidos pelo Fe²⁺, protegendo os lipídeos da oxidação de maneira concentração dependente, variando de aproximadamente 45 a 80% (e concentrações de 7,1 µg/mL a 114 µg/mL no meio reacional).

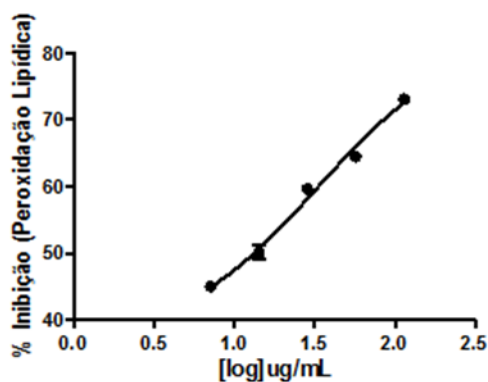


Figura II.14. Medida da Inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe²⁺. Os resultados representam a média de três determinações ± DP. p<0,05.

II.4.4 Avaliação do extrato otimizado de *cranberry* em cultura de células

II.4.4.1 Citotoxicidade em fibroblastos de camundongo L929

A atividade citotóxica *in vitro* do extrato de *cranberry* otimizado foi avaliada pelo ensaio com resazurina em fibroblastos de camundongos da linhagem L929.

A resazurina é um indicador fluorescente redox capaz de determinar a atividade metabólica celular. Células metabolicamente ativas mantêm a habilidade de reduzir a resazurina (forma oxidada), de coloração azul e não fluorescente, a resorufina, altamente fluorescente (Figura II.15). Células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica, sendo impossível reduzir o indicador, e assim, não geram sinal fluorescente (WANG et al, 2014).

Portanto, a quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, e pode ser quantificada utilizando um fluorímetro de microplaca com excitação/emissão de 540 nm/590 nm (RISS et al., 2013).



Figura II.15. Representação esquemática da redução metabólica da resazurina a resorufina. Figura adaptada de <www.promega.com.br> e WANG et al. (2014).

A curva resposta foi construída num intervalo de concentração de 3,9 µg/mL a 1000 µg/mL. Como apresentado na figura II.16, após 24 h de tratamento, com concentrações até 250 µg/mL do extrato de *cranberry* não provocou perda significativa da viabilidade celular em relação ao controle do solvente. Foi observada aproximadamente 20% de morte celular na concentração de 500 µg/mL e 82% de morte para a concentração de 1000 µg/mL. A CI_{50} calculada foi de 641,3 µg/mL.

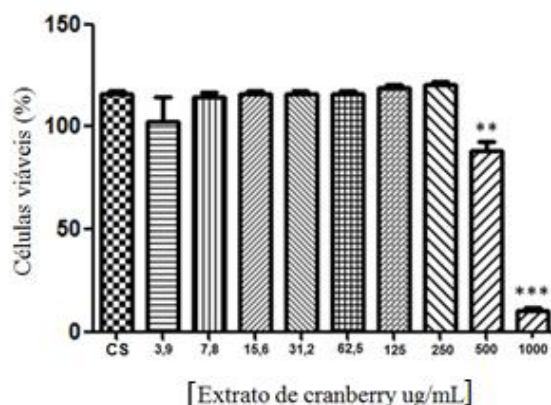


Figura II.16. Medida da viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados por 24h com concentrações crescentes do extrato otimizado de cranberry. ** $p < 0,05$ em relação ao controle solvente; *** $p < 0,01$ em relação ao controle solvente pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

II.4.4.2 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica em L929

A peroxidação lipídica em células L929 irradiadas com luz UVB foi determinada utilizando o ensaio de TBA. Tendo como base as concentrações de extrato que não causam danos às células L929 observadas no ensaio de citotoxicidade, para a avaliação da atividade fotoquimiopreventiva frente à peroxidação lipídica induzida pela radiação UVB, os fibroblastos de camundongos foram pré-tratados com uma concentração do extrato otimizado de *cranberry* de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os radicais livres e o estresse oxidativo induzidos pela radiação UV são fortemente relacionados com a peroxidação lipídica das membranas celulares e com o aumento dos níveis de MDA, um biomarcador da peroxidação lipídica. O aumento de MDA tem sido associado a eventos prejudiciais na membrana celular, tais como a perda de fluidez, a inativação de enzimas, o aumento da permeabilidade da membrana a íons, e, finalmente, a ruptura da membrana, que conduz à liberação de organelas celulares (SONG; GAO; XU, 2014).

Sob as condições experimentais, houve um aumento expressivo da peroxidação lipídica nas células irradiadas não tratadas em comparação às células do grupo controle não irradiado (0,178 – 3,36 nM MDA/ μg proteína). Como ilustrado na figura II.17, a quantidade de MDA foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com extrato otimizado de cranberry, em relação ao controle irradiado (41% de redução). Além disso, foi observado que não houve diferença significativa entre o controle não irradiado não tratado para o grupo tratado com 100 μg de extrato e irradiado. A capacidade do extrato otimizado de cranberry em reduzir a

peroxidação lipídica, pode ser resultado de sua elevada atividade antioxidante preventiva, que elimina os radicais iniciadores da peroxidação.

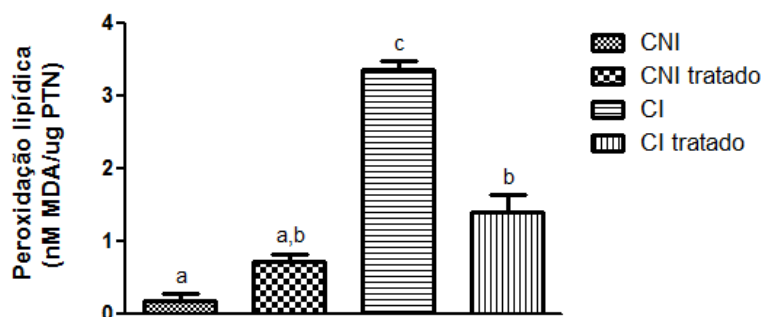


Figura II.17. Medida da geração de peróxidos lipídicos (expressa em quantidade de malondialdeído formado) pelos fibroblastos L929 tratados com 100 µg/mL de extrato otimizado de cranberry e submetidos à uma única dose de radiação UVB (10 J/cm²). Os resultados representam a média de três determinações. Letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

II.4.4.3 Espectro de absorção UV/Vis e avaliação da fotoestabilidade do extrato de *cranberry*

A figura II.18 apresenta o espectro de absorção da solução hidroalcolica (80%) extrato otimizado de *cranberry* (0,5 mg/mL), que apresentou um pico de absorção em 280 nm, semelhante ao PABA, um dos filtros solares mais utilizados em formulações fotoprotetoras, que possui λ máx. em 283 nm (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

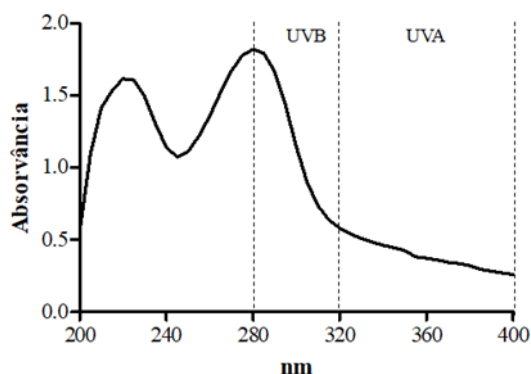


Figura II.18. Espectro de absorção do extrato de cranberry em etanol 80%, 0,5 mg/mL.

A figura II.19 A e B mostra os espectro de absorção obtido após irradiação do extrato com luz UVA e UVB durante 2h.

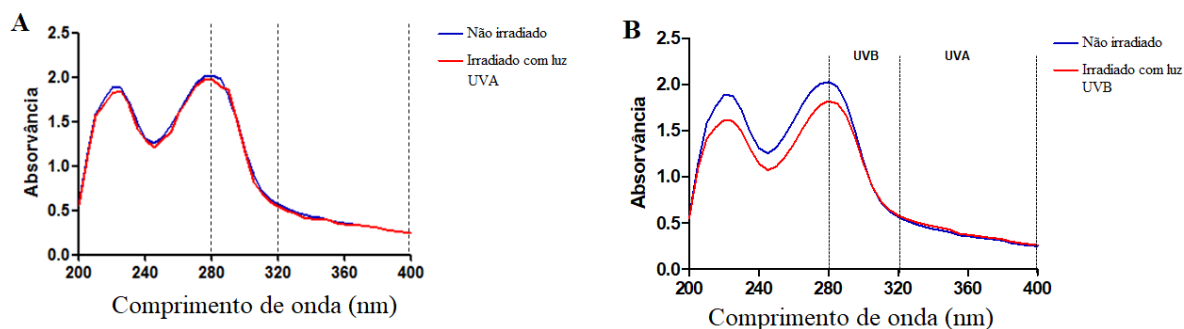


Figura II.19. Espectro de absorção das soluções hidroalcoólicas do extrato de cranberry (0,5 mg/mL) irradiadas durante 2h com luz UVA (A) e luz UVB (B).

A ASC do extrato não irradiado foi de 216,1 (figura II.18); ao passo que as áreas sob a curva obtidas para os extratos irradiados por 2h com luz UVA foi de 202,2 e UVB, 189,3, (figura II.19), representando uma perda de 6,43% e 12,4% após a exposição às radiações UVA e UVB, respectivamente. Este resultado sugere uma fotoestabilidade do extrato de cranberry quando comparado a filtros solares comumente utilizados em formulações fotoprotetoras. De fato, salicilato de octila, metoxinamato de octila e benzofenona 3, presentes em aproximadamente 75% dos protetores solares disponíveis no mercado, demonstram perder sua capacidade absorptiva na região UVA e UVB dentro de 60-90 minutos de exposição, diminuindo sua eficiência fotoprotetora (HOJEROVÁ; MEDOVČÍKOVÁ; MIKULA, 2011).

II.4.4.4 Determinação da atividade fotoprotetora em L929

A figura II.20 mostra que o protetor solar comercial (FPS 15) protegeu as células contra a redução da viabilidade, de maneira estatisticamente significativa em relação ao controle irradiado, promovendo um aumento de 29,3% das células viáveis.

A formulação contendo 2% do extrato otimizado de *cranberry*, foi capaz de absorver a radiação UVB e proteger a viabilidade dos fibroblastos em 10,7%, com diferença significativa em relação ao controle irradiado (CI) e ao branco. No entanto, a formulação contendo 2% de extrato otimizado do cranberry não apresentou eficácia absorvedora da radiação semelhante ao protetor comercial (FPS 15), o que já era esperado, uma vez que produtos fotoprotetores comerciais são formulados com misturas complexas de filtros solares orgânicos e inorgânicos, promovendo um efeito fotoprotetor sinérgico, de forma a propiciar uma proteção mais eficiente (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007) e, neste estudo, o extrato otimizado de *cranberry* foi

incorporado em uma formulação gel-creme relativamente simples, como único ingrediente ativo presente. Portanto, o resultado observado é bastante promissor e revela grande potencial no emprego do extrato de *cranberry* em formulações fotoprotetoras.

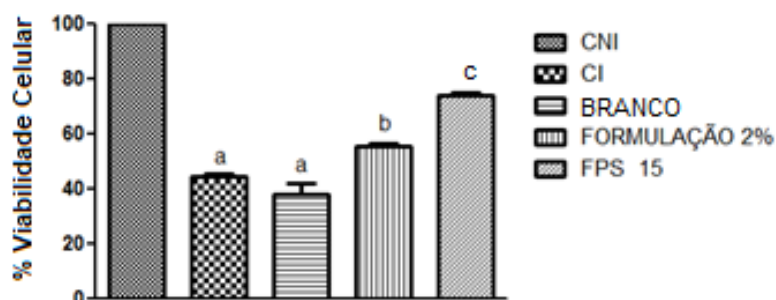


Figura II.20. Viabilidade de fibroblastos protegidos ou não por fotoprotetor comercial (FPS 15); por formulação contendo 2% de extrato otimizado de *cranberry* ou pelo branco (formulação sem adição de extrato). CNI: controle não irradiado; CI: controle irradiado. Os resultados representam a média de três determinações. Letras diferentes foram estatisticamente diferentes pelo teste de variância ANOVA, seguida de Bonferroni, com $p < 0,05$.

II.4.4.5 Determinação *in vitro* do FPS

A tabela II.8 resume os valores de FPS determinados para cada amostra. Como esperado, o valor FPS *in vitro* para o extrato *cranberry* foi de $12,92 \pm 0,16$. Quando 2 % de extrato otimizado de *cranberry* foi adicionado à formulação de gel creme, o valor do FPS foi de $8,04 \pm 0,08$.

Tabela II.9. Valores de FPS obtidos empregando a metodologia de Mansur.

Amostra	FPS
Protetor solar com FPS 15 descrito na embalagem	$16,08 \pm 0,03$
Formulação contendo 2% do extrato otimizado	$8,04 \pm 0,08$
Formulação placebo	$1,4 \pm 0,05$
Extrato otimizado	$12,92 \pm 0,16$

O resultado obtido mostrou a capacidade do extrato em absorver a radiação UV e, portanto, provou o potencial de proteção contra a RUV. Além disso, o extrato isolado também mostrou-se estável quando exposto à irradiação UVB e UVA (figura II.19 A e B).

Esta atividade mostrou a utilidade profilática do cranberry em uma formulação fotoprotetora, representando uma alternativa mais segura para filtros solares orgânicos, uma vez que alguns filtros mais utilizados são prejudiciais à saúde.

II.5 CONCLUSÕES

A radiação UV é o principal fator de risco causador do câncer de pele em humanos. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o emprego de substâncias antioxidantes de origem natural, tais como extratos brutos de plantas com propriedades antioxidantes, reduz os danos à pele induzidos pela radiação UV. Os resultados apresentados neste trabalho, demonstram que o estudo da otimização de parâmetros relativos ao processo de extração do cranberry foi satisfatório, permitindo a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos.

Na avaliação da citotoxicidade em cultura de células da linhagem L929, foi demonstrado que o extrato apresenta baixo ou nenhum potencial citotóxico.

O extrato otimizado de cranberry mostrou-se eficaz em sequestrar radicais livres, apresentando um elevado potencial antioxidante ao inibir satisfatoriamente a quimioluminescência gerada no sistema xantina/XOD/luminol; a peroxidação lipídica empregando gema de ovo como substrato lipídico; bem como reduzir danos induzidos pela radiação UVB a nível celular em fibroblastos de camundongos da linhagem L929, prevenindo a peroxidação lipídica nas células.

Sob RUVA e UVB, o extrato demonstrou ser fotoestável, sendo uma característica indispensável filtros solares.

Além disso, o extrato, quando incorporado a uma formulação gel-creme, apresentou elevado potencial fotoprotetor, protegendo células da linhagem L929 da morte celular induzida pela radiação UVB.

Estes dados são de extrema relevância, pois fornecem informações inéditas acerca do potencial fotoprotetor e antioxidante do extrato de cranberry.

REFERÊNCIAS

AHN, J.; PETERS, U.; ALBANES, D.; PURDUE, M. P.; ABNET, C. C.; CHATTERJEE, N.; HORST, R. L.; HOLLIS, B. W.; HUANG, W. Y.; SHIKANY, J. M.; HAYES, R. B. Serum vitamin D concentration and prostate cancer risk: A nested case-control study. **J Natl Cancer Inst.** v. 100, p. 796–804, 2008.

AKRMAN, J.; KUBÁČ, L.; BENDOVIÁ, H.; JÍROVÁ, D.; KEJLOVÁ, K. Quartz plates for determining sun protection in vitro and testing photostability of commercial sunscreens. **Int J Cosmet Sci.** v. 31, n. 2, p.119-129, 2009.

ALSHAHRANI, F.; ALJOHANI, N. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. **Nutrients.** v.5, n. 9, p. 3605-3616, 2013.

AMARO-ORTIZ, A.; YAN, B.; D’ORAZIA, J. A. D. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules.** v. 19, n. 9, p. 6202-6219, 2014.

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics for melanoma skin cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 06/05/2017.

ANDERSEN, P. A.; BULLER, D. B.; WALKOSZ, B. J.; SCOTT, M. D; MALOY, J. A.; CUTTER, G. R.; DIGNAN, M. D. Environmental Cues to Ultraviolet Radiation and Personal Sun Protection In Outdoor Winter Recreation. **Arch Dermatol.** v. 146, n. 11, p. 1241–1247, 2010.

ANDRADE-FILHO, T.; RIBEIRO, T.C.S; DEL NERO, J. The UV-VIS absorption spectrum of the flavonol quercetin in methanolic solution: A theoretical investigation. **Eur Phys J.** v. 29, p. 253–259, 2009.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Official methods of analysis. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

APALLA, Z.; LALLAS, A.; SOTIRIOU, E.; LAZARIDOU, E.; IOANNIDES, D. Epidemiological trends in skin cancer. **Dermatol Pract Concept.** v. 7, n. 2, p. 1-6, 2017.

APEL, C.; TANG, J.; EBINGHAUS, R. Environmental occurrence and distribution of organic UV stabilizers and UV filters in the sediment of Chinese Bohai and Yellow Seas. **Environ Pollut.** v. 21, n. 235, p. 85-94, 2017.

APRIOKU, J. S. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. **J Reprod Infertil.** v. 14, n. 4, p.158-172, 2013.

AUTIER, P. Do high factor Sunscreens offer protection from melanoma? **West J Med.** v. 173, n. 1, p. 58, 2000.

AUTIER, P.; GANDINI, S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arch Intern Med.** v. 167, n. 16, p. 1730-7, 2007.

AZOULAY, Elizabeth. *100.000 years of beauty: classical age/confrontations*. 1a Ed. Paris: Gallimard, 2009.

BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **An Bras Dermatol.** v. 86, n.4, p. 732-742, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.** v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BAROLET, D.; CHRISTIAENS, F.; HAMBLIN, M. R. Infrared and skin: Friend or foe. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** v.55, p. 78-85, 2016.

BARRERA, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. **ISRN Oncol.** v. 2012, p. 1-21, 2012.

BARTH, J. Johann Wilhelm Ritter (1776-1810) and the discovery of ultraviolet irradiation 185 years ago. **Hautarzt.** v.38, p.301–303, 1987.

BATTIE, C.; VERSCHOORE, M. Cutaneous solar ultraviolet exposure and clinical aspects of photodamage. **Indian J Dermatol Venereol Leprol,** v.78, 8, Suppl S1, p. 9-14, 2012.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 224, n. 3, p. 241-248, 2007.

BENS, G. Sunscreens. **Ad. Exp. Med. Biol.** v. 2014, n. 810, p. 429-463, 2014.

BESARATINIA, A.; YOON, J.; SCHROEDER, C.; BRADFORTH, S. E.; COCKBURN, M, PFEIFER GP. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. **FASEB J.** v.5, n.9, p. 3079-3091, 2011.

BEUKERS, R.; BERENDS, W. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. **Biochim Biophys Acta.** v.15, n. 41, p. 550–551, 1960.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R.; OLIVEIRA, E. L.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, p. 965–977, 2008.

BIDINOTTO, J. H.; BELO, E. M. Modal Shape Analysis Using Thermal Imaging. **J Aerosp Technol Manag** v.7, n.2, p.185-192, 2015.

BILER, M.; BIEDERMANN, D.; VALENTOVÁ, K.; KŘEN, V.; KUBALA, M. Quercetin and its analogues: optical and acido-basic properties. **Phys Chem Chem Phys**.v. 19, n. 39, p. 26870-26879, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**. v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BISWAS, N.; BALAC, P.; NARLAKANTI, S. K.; HAQUE, E.; HASSAN, M. Identification of Phenolic Compounds in Processed Cranberries by HPLC Method. **J Nutr Food Sci**. v. 3, n. 181, 2012.

BLEASEL, M. D.; ALDOUS, S. In vitro evaluation of sun protection factors of sunscreen agents using a novel UV spectrophotometric technique. **Int J Cosmet Sci**. v. 30, n. 4, p. 259-270, 2008.

BOER, M.; DUCHNIK, E.; MALESZKA, R.; MARCHLEWICZ, M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. **Postepy Dermatol Alergol**. v. 33, n. 1, p. 1-5, 2016.

BOITEUX S, JINKS-ROBERTSON S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v. 193, n. 4, p.1025-1064, 2013.

BRADLEY, N. **The response surface methodology**. Dissertação. Department of Indiana University of South Bend. Mathematical Sciences, 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. Disponível em:http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132. Acesso em: 14/03/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF., 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 12/09/2017.

BREITENBACH M, ECKL P. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. **Biomolecules**. v. 5, n. 2, p. 1169-1177, 2015.

BREITKREUTZ, D.; KOXHOLT, I.; THIEMANN, K.; NISCHT, R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. **Biomed Res Int**. v. 2013, n. 2013, p. 1-16, 2013.

BREM, R.; GUVEN, M.; KARRAN, P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. **Free Radic Biol Med**. v.107, p. 101-109, 2016.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochem Photobiol**. v.84, n. 3, p. 539-549, 2008.

BRIASCO, B.; CAPRA, P.; MANNUCCI, B.; PERUGINI, P. Stability Study of Sunscreens with Free and Encapsulated UV Filters Contained in Plastic Packaging. **Pharmaceutics**. v. 9, n. 19, p. 1-24, 2017

BROWN, T. A. *Genomes*. 3a Ed. Nova Iorque: Wiley-Liss, 2002.

BUCHHOLZ, G.; EHMANN, B.; WELLMANN, E. Ultraviolet Light Inhibition of Phytochrome-Induced Flavonoid Biosynthesis and DNA Photolyase Formation in Mustard Cotyledons (*Sinapis alba* L.). **Plant Physiol**. v. 1, n. 108, p. 227-234, 1995.

BULLER, D. B.; COKKINIDES, V.; HALL, H. I.; HARTMAN, A. M.; SARAIYA, M.; MILLER, E.; PADDOCK, L.; GLANZ, K. Prevalence of sunburn, sun protection, and indoor tanning behaviors among Americans: review from national surveys and case studies of 3 states. **J Am Acad Dermatol**. v. 65, n. 5, p. 114-123, 2011.

CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Mol Aspects Med**. v. 25, n. 1-2, p. 17-26, 2004.

CADET, J., DOUKI, T. AND RAVANAT, J.-L. Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation. **Photochem Photobiol**. v. 91, p. 140–155, 2015.

CADET, J.; WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 5, n. 2, p. 1-18, 2013.

CANCER COUNCIL, National Skin Cancer Action Week 2017. Disponível em: <http://www.cancer.org.au/preventing-cancer/sun-protection/campaigns-and-events/national-skin-cancer-action-week.html>. Acesso em 12/11/2017.

CHANG, C.; MURZAKU, E. C.; PENN, L.; ABBASI, N. R.; DAVIS, P. D.; BERWICK, M.; POLSKY, D. (2014). More Skin, More Sun, More Tan, More Melanoma. **Am J Public Health**. v. 104, n. 11, p. 92-99, 2014.

CHANG, W. S.; LIN, E. Y.; HSU, H. S.; HU, P. S.; CHUANG, C. L.; LIAO, C. H.; FU, C. K.; SU, C. H.; GONG, C. L.; HSIAO, C. L.; BAU, D. T.; TSAI, C. W. Baicalin Scavenged Reactive Oxygen Species and Protected Human Keratinocytes Against UVB-induced Cytotoxicity. **In Vivo**. v. 30, p. 605-610, 2016.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environ Mol Mutagen**. v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.

CHEN, H.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. **Int J Mol Sci**. v. 13, p. 260-285, 2012.

CHEN, H.; ZUO, Y.; DENG, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**. v. 913, n 1-2, p. 387-395, 2001.

CHEN, L.; HU, J.Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **J Am Acad Dermatol**. doi: 10.1016/j.jaad.2012.02.009.

CHERNG, J. Y.; CHEN, L. Y.; SHIH, M. F. Preventive effects of β -thujaplicin against UVB-induced MMP-1 and MMP-3 mRNA expressions in skin fibroblasts. **Am J Chin Med**. V.40, n. 2, p. 387-98, 2012.

CHIPPERFIELD, M. P.; DHOMSE, S.S.; FENG, W.; MCKENZIE, R.L.; VELDERS, G.J.M.; PYLE, J.A. Quantifying the ozone and ultraviolet benefits already achieved by the Montreal Protocol. **Nature Communications**. v.6, p. 1-8, 2015.

CHISVERT, A.; TARAZONA, I.; SALVADOR, A. A reliable and environmentally-friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products. **Anal Chim Acta**. v. 790, 61-67, 2013.

CHO, Y. H.; PAK, S. H. Optimization in multiple response model with modified desirability function. **Asian J Quality**. v. 7, n. 3, 2006.

CHUNG, S. Basal cell carcinoma. **Arch Plast Surg**. v. 39, n. 2, 2012.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatol Alergol**. v. 30, n. 1, p. 30-41, 2013.

CLIMSTEIN, M.; FURNESS, J.; HING, W.; WALSH, J. Lifetime prevalence of non-melanoma and melanoma skin cancer in Australian recreational and competitive surfers. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v. 32, n. 4, p. 207-213, 2016.

COLLINS, L. M.; DZIAK, J. J.; LI, R. Design of Experiments with Multiple Independent Variables: A Resource Management Perspective on Complete and Reduced Factorial Designs. **Psychol Methods.** v. 14, n. 3, p. 202–224, 2009.

CORDERO, R.R.; SECKMEYER, G.; DAMIANI, A.; RIECHELMANN, S.; RAYAS, J.; LABBE, F.; LAROZE, D. The world's highest levels of surface UV. **Photochem Photobiol. Sci.** v.13, n. 1, p. 70-81, 2014.

CÔTÉ, J.; CAILLET, S.; DOYON, G.; SYLVAIN, J. F.; LACROIX, M. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 50, p. 666–679, 2010.

CUTOLO, M. Vitamin D or hormone D deficiency in autoimmune rheumatic diseases, including undifferentiated connective tissue disease. **Arthritis Res Ther.** v. 10, p. 6, 2008.

D'ORAZIO J, JARRETT S, AMARO-ORTIZ A, SCOTT T. UV Radiation and the Skin. **Int J Mol Sci.** v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

DALL'ACQUA, S.; MIOLO, G.; INNOCENTI, G.; CAFFIERI, S. The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. **Molecules.** v. 17, p. 8898-8907, 2012.

DAMIAN, D. L., MATTHEWS, Y. J.; PHAN, T. A.; HALLIDAY, G. M. An action spectrum for ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. **Br J Dermatol.** v. 164, n.3, p. 657–659, 2011.

DAMIAN, D. L.; MATTHEWS, Y. J.; HALLIDAY, G. M. Topical riboflavin attenuates ultraviolet B- and ultraviolet A-induced immunosuppression in humans . **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v.26, n.2, p.66-69, 2010.

DAMSKY, W. E.; ROSENBAUM, L. E.; BOSENBERG, M. Decoding Melanoma Metastasis. **Cancers.** v. 3, n. 1, 2011.

DE PAULA, R. L.; PARUSSULO, A. L. A.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Evaluation of Sun Protection Factor of Cosmetic Formulations by a Simple Visual In Vitro Method Mimicking the In Vivo Method. **J Pharm Sci.** v. 10, n. 2, p. 726-732, 2012.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bio- availability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxid Redox Signal.** v.18, p.1818 – 1892, 2013.

DeLUCA, H. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. **BoneKey**. v. 3, n. 479, p. 1-8, 2014.

DIEPGEN, T. L.; MAHLER, V. The epidemiology of skin cancer. **Br J Dermatol**. v. 146, n. 61, p. 1-6, 2002.

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

DIMITROVSKA, C.; MANFREDINI, S.; ZIOSI, P.; MOLESINI, S.; DISSETTE, V.; MAGRI, I.; SCAPOLI, C.; CARRIERI, A.; DURINI, E.; VERTUANI, S. Factors affecting SPF in vitro measurement and correlation with in vivo results. **Int J Cosmet Sci**. v. 39, n. 3, p. 310-319, 2017.

DOHADWALA, M. M.; HOLBROOK, M.; HAMBURG, N. M.; SHENOUDA, S. M.; CHUNG, W. B.; TITAS, M.; KLUGE, M. A.; WANG, N.; PALMISANO, J.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B.; VITA, J. A. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. **Am J Clin Nutr**. V. 93, n. 5, p. 934 - 940, 2011.

DOURMISHEV, L. A.; RUSINOVA, D.; BOTEV, I. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. **Indian Dermatol Online J**. v. 4, n. 1, p.12-17, 2013.

DUFFY, J. F.; CZEISLER, C. A. Effect of Light on Human Circadian Physiology. **Sleep Med Clin**. V. 4, n. 2, p. 165-177, 2009.

DUTHIE, S. J.; JENKINSON, A. M.; CROZIER, A.; MULLEN, W.; PIRIE, L.; KYLE, J.; YAP, L. S.; CHRISTEN, P.; DUTHIE, G. G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. **Eur J Nutr**. v. 45, p.113-122, 2005.

EILERS, S.; BACH, D. Q.; GABER, R.; BLATT, H.; GUEVARA, Y.; NITSCHKE, K.; KUNDU, R. V.; ROBINSON, J. K. Accuracy of Self-report in Assessing Fitzpatrick Skin Phototypes I Through VI. **JAMA Dermatol**. v. 149, n. 11, p. 1289–1294, 2013.

EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: https://oaspub.epa.gov/enviro/uv_search_v2?minx=81.25832&miny=37.25985&maxx=-81.12099&maxy=37.34178. Acesso em: 09/01/2018.

Euromonitor International. Sun Care in Australia. Disponível em: <http://www.euromonitor.com/sun-care-in-australia/report>. Acesso em: 02/12/2017.

FAGEON, L.; MOYAL, D.; COUTET, J.; CANDAU, D. Importance of sunscreen products spreading protocol and substrate roughness for in vitro sun protection factor assessment. **Int J Cosmet Sci.** v. 31, p. 405–417, 2009.

FAHLMAN, B. M.; KROL, E. S. Inhibition of UVA and UVB radiation-induced lipid oxidation by quercetin. **J Agric Food Chem.** v. 57, n. 12, p. 5301-5305, 2009.

FDA. 1978. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Establishment of a Monograph; Notice of Proposed Rulemaking, 43 Fed. Reg. 38206 (Aug. 25, 1978).

FDA. 1993. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Tentative Final Monograph; Proposed Rule, 58 Fed. Reg. 28194 (May 12, 1993).

FDA. Questions and Answers: FDA announces new requirements for over-the-counter (OTC) sunscreen products marketed in the U.S. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/resourcesforyou/consumers/buyingusingmedicinesafely/understandingover-the-countermedicines/ucm258468.htm>. Acesso em 04/01/2018.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A. G.; KRAMER, B.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. **Head Face Med.** v. 12, n. 11, p. 1-7, 2016.

FELS, D. Endogenous physical regulation of population density in the freshwater protozoan *Paramecium caudatum*. **Sci Rep.** v. 7, n. 13800, p. 1-6, 2017.

FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Anal Chim Acta.** v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007.

FERRERO, L.; PISSAVINI, M.; DOUCET, O. How a calculated model of sunscreen geometry can explain in vitro and in vivo SPF variation. **Photochem Photobiol Sci.** v. 9, n. 4, p.540-551, 2010.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science.** V. 3, n. 222, p. 1-15, 2012.

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

FITZPATRICK, T. B.; MOSHER, D. B. Pigmentação cutânea e distúrbios do metabolismo da melanina. In: ISSELBACHER, Kurt J. et al. *Medicina interna*. 9a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

FITZPATRICK, T. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol**. v. 124, p. 869-871, 1988.

FLAMMER, A. J.; MARTIN, E. A.; GOSSL, M.; WIDMER, R. J.; LENNON, R. J.; SEXTON, J. A.; LOEFFLER, D.; KHOSLA, S.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Polyphenol-rich cranberry juice has a neutral effect on endothelial function but decreases the fraction of osteocalcin-expressing endothelial progenitor cells. **Eur J Nutr**. v. 52, p. 289–96, 2013.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R. Protetores Solares. **Quim Nov**. n. 1, p. 153-158, 2007.

FREDERICE, R.; FERREIRA, A. P. G.; GEHLEN, M. H. Molecular fluorescence in silica particles doped with quercetin-Al³⁺ complexes. **Braz Chem Soc**. v. 21, n. 7, p. 1213-1217, 2010.

FONSECA, L.L.; OLIVEIRA, P.B. A planta de mirtilo: morfologia e fisiologia. Divulgação **AGRO**. v. 556, n. 2, p. 1-26, 2007.

FUJIKAKE, K.; TAGO, S.; PLASSON, R.; NAKAZAWA, R.; OKANO, K.; MAEZAWA, D.; MUKAWA, T.; KURODA, A.; ASAKURA, K. Problems of in vitro SPF measurements brought about by viscous fingering generated during sunscreen applications. **Skin Pharmacol Physiol**. v. 27, n. 5, p. 254-262, 2014.

GANESAN K, XU B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. **Nutrients**. v. 9, n. 455, p. 1-17, 2017.

GAROLI, D.; PELIZZO, M. G.; BERNARDINI, B.; NICOLOSI, P.; ALAIBAC, M. Sunscreen tests: correspondence between in vitro data and values reported by the manufacturers. **J Dermatol Sci**. v. 52, n. 3, p. 193-204, 2008.

GAROLI, D.; PELIZZO, M. G.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; TONIN, E.; ALAIBAC, M. Effectiveness of different substrate materials for in vitro sunscreen tests. **J Dermatol Sci**. v. 56, n. 2, p. 89-98, 2009.

GENETIC HOME REFERENCES. Nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/nonbullous-congenital-ichthyosiform-erythroderma>. Acesso em: 15/11/2017.

GERS-BARLAG, H.; KLETTE, E.; WITTERN, K. P. How reproducible are in vitro transmittance measurements. **SÖFW Journal**. v. 130, p. 2-11, 2004.

GIA. GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. Sun care products – a strategic business report. Disponível em: <http://www.strategyr.com/pressMCP-6158.asp>. Acesso em 21/09/2017.

GILBERT, Scott. F. *Developmental Biology*. 6a Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

GLAZER, A. M.; WINKELMANN, R. R.; FARBERG, A. S.; RIGEL, D. S. Analysis of Trends in US Melanoma Incidence and Mortality. **JAMA Dermatol.** v. 153, n. 2, p. 225-226, 2017.

GODINHO, M. M.; HOSSY, B. H.; NIEMEYER-CORBELLINI, J. P.; RAMOS-E-SILVA, M. Perfil dos filtros solares utilizados nos fotoprotetores no Brasil. **Surg Cosmet Dermatol.** v. 9, n. 3, p. 242-246, 2017.

GONÇALVES, N. P.; DE LUCENA, E. M. P.; BONILLA, O. H.; DA SILVEIRA, M. R. S. Polyphenols and antioxidant activity of four fruits native to the coast of Ceara under different maturation stages. **Rev Bras Frutic.** v.39, n.1, p. 1-7, 2017.

GORDON, L. G.; ROWELL, D. Health system costs of skin cancer and cost-effectiveness of skin cancer prevention and screening: a systematic review. **Eur. J. Cancer. Prev.** v. 24, n. 2, p. 141-149, 2015.

GOUVÊA, M. M.; LIMA, G. S.; SILVA, N. A. A.; PEREIRA, N.; ANNIBAL, D.; MARQUES, F. F. DE C. Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para pré-tratamento de amostras. **Quím Nova**, v.37, n.2, p. 337-343, 2014.

GRADY, L. D. Zinc oxide in face powders. **J Soc Cosm Chem.** v. 1, p. 17-21, 1947.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **J Nutr.** v.134, p. 613–617, 2004.

GUVEN, M.; BARNOUIN, K.; SNIJDERS, A. P.; KARRAN, P. Photosensitized UVA-Induced Cross-Linking between Human DNA Repair and Replication Proteins and DNA Revealed by Proteomic Analysis. **J Proteome Res.** v. 15, n. 12, p. 4612-4623, 2016.

GUY, G. P.; MACHLIN, S. R.; EKWEME, D. U.; YABROFF, K. R. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. **Am J Prev Med.** v. 48, n. 2, p. 183-187, 2015.

HALLIDAY, G. M.; BYRNE, S. N.; DAMIAN, D. L. Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis. **Semin Cutan Med Surg.** v. 30, n.4, p. 214-221, 2011.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4a Ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2007.

HAN, C.; SRIVASTAVA, A. K.; CUI, T.; WANG, Q. E.; WANI, A. A. Differential DNA lesion formation and repair in heterochromatin and euchromatin. **Carcinogenesis**. v. 37, p. 2, p.129-38, 2016.

HARRIS, Maria Inês Nogueira Camargo. *Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento*. 3. Ed. São Paulo: Senac, 2009.

HARRISON, G. I.; YOUNG, A. R. Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin. **Methods**. v. 28, n. 1, p. 14-19, 2002.

HASHIZUME, H. Skin Aging and Dry Skin. **J Dermatol**. v. 31, n. 8, p. 603-609, 2004.

HAYDAR, K.; BURKHART, C. G. Sunscreen regulations and use of anti-inflammatory agents in sunscreens. **Dermatol Online J**. v. 19, n. 14, 2013.

HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; KOCKOTT, D.; KUCKUK, R.; HEISE, H. M. Comparison of sun protection factors determined by an in vivo and different in vitro methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. **Int J Cosmet Sci**. v. 26, n. 2, p. 79-89, 2004.

HERSCHEL W. Experiments on the Refrangibility of the Invisible Rays of the Sun. **Philos. Trans. R. Soc. London**. v. 90, p. 284–292, 1800.

HILTON, Lisa. *Elizabeth I – uma biografia*. 1a Ed. Rio de Janeiro: Zahar, 2016.

HOAT, S.B. Development of the stratum corneum. **Br J Dermatol**. v.171, n. 2-5, 2014.

HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A.; MIKULA, M. Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. **Int J Pharm**. v. 408, n.1, p. 27-38, 2011.

HOLICK, M. F. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. **Anticancer Res**. v. 36, n. 3, p. 1345-1356, 2016.

HOLTERHUES, C.; DE VRIES, E.; LOUWMAN, M. W.; KOLIJENOVIC, S.; NIJSTEN, T. Incidence and trends of cutaneous malignancies in the Netherlands. **J Invest Dermatol**. v. 130, n. 7, p. 1807–1812, 2010.

HOLZER, A. M.; ELMETS, C. A. The Other End of the Rainbow: Infrared and Skin. *The J Invest dermatol.* v. 130, n. 6, p. 1496-1499, 2010.

HWANG, Y. J.; PARK, H. J.; HAHN, H. J.; KIM, J. Y.; KO, J. H.; LEE, Y. W.; CHOE, Y. B.; AHN, K. J. Immediate pigment darkening and persistent pigment darkening as means of measuring the ultraviolet A protection factor in vivo: a comparative study. *Br J Dermatol.* v. 64, n. 6, p. 1356-1361, 2011.

HWANG, Y. P.; OH, K. N.; YUN, H. J.; JEONG, H. G. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *J Dermatol Sci.* v. 61, n. 1, p. 23-31, 2011.

IMOKAWA, G.; ISHIDA, K. Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging. *Int J Mol Sci.* v.16, n. 4, p. 7753-7775, 2015.

INAL, E. M.; KAHRAMAN, A.; KÖKEN, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol.* v. 26, n. 6, p. 536-539, 2001.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2011. 118p.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair.* v.12, n. 8, p. 620-636, 2013.

JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 107, n. 2, p. 8962-8968, 2010.

JAITLEY, S.; SARASWATHI, T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol* v. 16, n. 2, p. 239-244, 2012.

JAKI, T.; VASILEIOU, D. Factorial versus multi-arm multi-stage designs for clinical trials with multiple treatments. *Stat Med.* v. 36, n. 4, p. 563-580, 2017.

JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; LIM, H. W. Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *J Am Acad Dermatol,* v. 69, n. 6, p. 1-14, 2013.

JIANG, Q.; CAO, C.; ZHOU, C.; SONG, X.; HEALEY, S.; KOUTTAB, N.; CHU, W.; XU, A.; BI, Z.; WAN, Y. Quercetin attenuates UV- and H₂O₂-induced decrease of collagen type I in cultured human lens epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* v. 24, n. 2, p.164-174, 2008.

JIANG, Y.; RABBI, M.; KIM, M.; KE, C.; LEE, W.; CLARK, R. L.; MIECZKOWSKI, P. A.; MARSZALEK, P. E. UVA Generates Pyrimidine Dimers in DNA Directly. **Biophys J.** v. 96, p. 1151–1158, 2009.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. **J Lipid Res.** v.55, n.1, p.13-31, 2014.

JUNGFER, E.; ZIMMERMANN, B. F.; RUTTKAT, A.; GALENSA, R. Comparing procyanidins in selected vaccinium species by UHPLC-MS (2) with regard to authenticity and health effects. **J Agric Food Chem.** v. 60, p. 9688–9696, 2012.

JUZENIENE, A.; MOAN, J. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. **Dermatoendocrinol.** v.4, n. 2, p. 109-117, 2012.

KABIR, Y.; SEIDEL, R.; MCKNIGHT, B.; MOY, R. DNA repair enzymes: an important role in skin cancer prevention and reversal of photodamage-a review of the literature. **J Drugs Dermatol.** v. 14, n. 3, p. 297-303, 2015.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol.** v. 12, n. 4, p. 390-399, 2002.

KARIMPOUR, D. J.; RITTIÉ, L.; HAMMERBERG, C.; MIN, V. K.; VOORHEES, J. J.; ORRINGER, J. S.; SACHS, D. L.; HAMILTON, T.; FISHER, G. J. Molecular analysis of aggressive microdermabrasion in photoaged skin. **Arch Dermatol.** v.145, n. 10, p. 1114-1122, 2009.

KARRAN, P.; BREM, R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. **DNA Repair.** v. 44, p. 178-185, 2016.

KARTHIKEYAN RAMASAMY, MOHANA SHANMUGAM, AGILAN BALUPILLAI, KANIMOZHI GOVINDHASAMY, SRITHAR GUNASEELAN, GANESAN MUTHUSAMY, BEUALAH MARY ROBERT, RAJENDRA PRASAD NAGARAJAN. Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: Mechanisms and experimental models. **J Radiat Cancer Res.** v. 8, n. 1, p. 4-19, 2017.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chem.** v. 94, n.4, p. 550-557, 2006.

KIM, I. Y.; HE, Y. Y. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: regulation of DNA repair and inflammation. **Genes Dis.** v.1, p. 188-198, 2014.

KIM, M. J.; OHN, J.; KIM, J. H.; KWAK, H. K. Effects of freeze-dried cranberry powder on serum lipids and inflammatory markers in lipopolysaccharide treated rats fed an atherogenic diet. **Nutr Res Pract.** v. 5, p. 404–411, 2011.

KISELOVA, Y.; IVANOVA, D.; CHERVENKOV, T.; GEROVA, D.; GALUNSKA, B.; YANKOVA, T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. **Phytother Res.** v. 20, n. 11, p. 961-965, 2006.

KOBER, J.; GUGERELL, A.; SCHMID, M.; KAMOLZ, L-P.; KECK, M. Generation of a Fibrin Based Three-Layered Skin Substitute. **Biomed Res Int.** v. 2015, p.1-8, 2015.

KOCH, S.; PETTIGREW, S.; STRICKLAND, M.; SLEVIN, T.; MINTO, C. Sunscreen Increasingly Overshadows Alternative Sun-Protection Strategies. **J Cancer Educ.** v. 32, n. 3, p. 528-531, 2017.

KORAĆ, R. R.; KHAMBHOLJA, K. M. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. **Pharmacogn Rev.** v. 5, n. 10, p. 164-173, 2011.

KRIEG, T.; AUMAILLEY, M. The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. **Exp Dermatol.** v. 20, n. 8, p.689-695, 2011.

KRIPKE, M. L.; FISHER, M. S. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. **J Natl Canc Inst.** v. 57, n.1, p. 211-215, 1976.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of the oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutat Res.** v. 711, n.1-2, p.193-201, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal.** v. 2013, n. 162750, 2013.

LATHA, M. S.; MARTIS, J. SHOBHA, V.; SHINDE, RUTUJA. S. S.; BANGERA, S.; KRISHNANKUTTY, B.; BELLARY, S.; VARUGHESE, S.; RAO, P.; NAVEEN, B. R. Sunscreening Agents: a review. **J Clin Aesthet Dermatol.** v.6, n.1, p.16-26, 2013.

LAZARETH, V. Management of Non-melanoma Skin Cancer. **Semin Oncol Nurs.** v. 29, n. 3, p. 182-194, 2013.

LEE, I. T.; CHAN, Y. C.; LIN, C. W.; LEE, W. J.; SHEU, W. H. Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes. **Diabet Med.** v. 25, p. 1473–1477, 2008.

LEITER, U.; EIGENTLER, T.; GARBE, C. Epidemiology of skin cancer. **Adv Exp Med Biol.** v. 810, p. 120-140, 2014.

LENTH, R. V. Response-Surface Methods in R, Using rsm. **J Stat Softw.** v. 32, n. 7, 2009.

LEWIS, W.; SIMANYI, E.; LI, H.; THOMPSON, C. A.; NASTI, T. H.; JALEEL, T.; XU, H.; YUSUF, N. Regulation of ultraviolet radiation induced cutaneous photoimmunosuppression by Toll-like receptor-4. **Arch Biochem Biophys.** v. 508, n.2, p. 171-177, 2011.

LIM, Henry. W.; HÖNIGSMAN, Herbert; HAWK, John. L. M. *Photodermatology.* 1a Ed. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2007.

LODISH, Harvey; BERK, Arnold; ZIPURSKY, S. Laurence.; MATSUDAIRA, Paul; BALTIMORE, David; DARNELL, James. *Molecular Cell Biology.* 4a Ed. Nova Iork: W. H. Freeman, 2000.

LOPEZ-OJEDA, W.; OAKLEY, A. M. Anatomy, Skin (Integument). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/>. Acesso em: 18/12/2017.

LOTT, D. L.; STANFIELD, J.; SAYRE, R. M.; DOWDY, J. C. Uniformity of sunscreen product application: a problem in testing, a problem for consumers. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v.19, n. 1, p.17–20, 2003.

MAIER, T. C.; KORTING, H. C. Sunscreens – Which and What for? **Skin Pharmacol Physiol.** v.18, p. 253–262, 2005.

MALEŠEV, D.; KUNTI, V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. **J Serb Chem Soc.** v. 72, n. 10, p. 921–939, 2007.

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

MARKHAN, K. R.; RYAN, K. G.; BLOOR, S. J.; MITCHELL, K. A An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV - B enhancement. **Phytochemistry.** v. 48, p.791-794,1998.

MATTA, J. L.; RODRIGUEZ, G.; VILLA, J.; RUIZ, A. The Role of DNA Repair Capacity in Melanoma Skin Cancer Risk in a Population Chronically Exposed to High Levels of Sunlight. **Ochsner J.** v. 10, n. 2, p. 75-82, 2010.

MATTHEWS, Y. J., G. M. HALLIDAY, T. A. PHAN AND D. L. DAMIAN. A UVB wavelength dependency for local suppression of recall immunity in humans demonstrates a peak at 300 nm. **J Invest Dermatol.** v.130, n.6, p.1680–1684, 2010 a.

MATTHEWS, Y. J., HALLIDAY, G. M.; PHAN, T. A.; DAMIAN, D. L. Wavelength dependency for UVA-induced suppression of recall immunity in humans. **J Dermatol Sci.** v.59, n. 192–197, 2010 b.

McFARLAND, C. D.; KOROLEV, K. S.; KRYUKOV, G. V.; SUNYAEV, S. R.; MIRNY, L. A. Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.110, n. 8, p. 2910-2915, 2013.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors. **Nutr Rev.** v. 65, p. 490 –502, 2007).

MEAD, M. N. Arsenic: In Search of an Antidote to a Global Poison. **Environ Health Perspect.**v. 113, n. 6, p. 378–386, 2005.

MENDONÇA, Marco Aurélio Moraes, de. *Investigação da cintilação ionosférica no Brasil e seus efeitos no posicionamento por GNSS.* **2013. 144f.** Dissertação (Mestrado em Ciências Cartográficas) - Universidade Estadual Paulista - Campus de Presidente Prudente Faculdade de Ciências e Tecnologia, São Paulo.

MENG, X.; MA, Q.; BAI, H.; WANG, Z.; HAN, C.; WANG, C. Simultaneous separation and determination of 15 organic UV filters in sunscreen cosmetics by HPLC-ESI-MS/MS. **Int J Cosmet Sci.** v. 39, n. 4, p. 386-392, 2017.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia.** v. 18, n. 2, p. 81-87, 2002.

MILONE, A. C.; WUENSCH, C. A.; RODRIGUES, C. V.; JABLONSKI, F. J.; CAPELATO, H. V.; VILAS-BOAS, J. W.; CECATTO, J. R.; NETO, T. V. Introdução à astronomia e astrofísica. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Divisão de Astrofísica. INPE: São José dos Campos, 2013.

MIZUNO, M.; KUNIMOTO, K.; NARU, E.; KAMEYAMA, K.; FURUKAWA, F.; YAMAMOTO, Y. The effects of continuous application of sunscreen on photoaged skin in Japanese elderly people – the relationship with the usage. **Clin Cosmet Investig Dermatol.** v.9, p.95-105, 2016.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol**. v. 84, n.3, p. 263-269, 2009.

MONTEIRO, E. O. Filtros solares e fotoproteção. **RBM Especial Dermatologia e Cosmiatria**. v.67, p. 5-18, 2010.

MONTELLA A, GAVIN A, MIDDLETON R, AUTIER, P.; BONIOL, M. Cutaneous melanoma mortality starting to change: a study of trends in Northern Ireland. **Eur J Cancer**. v. 45, n. 13, p. 2360–2660, 2009.

MOYAL, D. D.; FOURTANIER, A. M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet - simulated radiation and natural sunlight – induced immunosuppression in human beings. **J Acad Dermatol**. v. 58, n.5, p.149-154, 2008.

MOYAL, D.; REFRÉGIER, J. L.; CHARDON, A. In vivo measurement of the photostability of sunscreen products using diffuse reflectance spectroscopy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**. V. 18, n. 1, p. 14-22, 2002.

MUKHERJEE, M.; BANDYOPADHYAY, P.; KUNDU, D. Exploring the role of cranberry polyphenols in periodontitis: A brief review. **Journal of Indian Society of Periodontology**. v.18, n. 2, p.136-139, 2014.

MURILLO, E.; BRITTON, G. B.; DURANT, A. A. Antioxidant activity and polyphenol content in cultivated and wild edible fruits grown in Panama. **J Pharm Bioallied Sci**. v. 4, n. 4, p. 313–317, 2012.

MUTHUMANI, T.; SUDHAHAR, V.; MUKHOPADHYAY, T. Review on Sunscreens and Sun Protection factor. **Res J Topic Cosmet Sci**. v. 6, n. 2, 2015.

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

NASA (2016). The Sun. Disponível em: <https://www.nasa.gov/sun>. Acesso em: 21/10/2017.

NORVAL, M. Effects of solar radiation on the human immune system. **Photochem Photobiol**. v. 63, p. 28-40, 2001.

OMS (2003). Organização Mundial de Saúde. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>. Acesso em: 07/05/2017.

OSTERWALDER, U. AND HERZOG, B. Sun protection factors: worldwide confusion. **Br J Dermatol**. v. 161, p.13–24, 2009.

PACHOLCZYK, M.; CZERNICKI, J.; FERENC, T. The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on induction of skin cancers. **Med Pr**. v. 67, n. 2, p. 255-66, 2016.

PADEKEN, J.; ZELLER, P.; GASSER, S. M. Repeat DNA in genome organization and stability. **Curr Opin Genet Dev**. v. 31, p. 12-19, 2015.

PANDEL, R.; POLJŠAK, B.; GODIC, A.; DAHMANE, R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. **ISRN Dermatol**. v. 2013, n. 930164, 2013.

PANICH, U.; SITTITHUMCHAREE, G.; RATHVIBOON, N.; JIRAWATNOTAI, S. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. **Stem Cells Int**. v. 2016, p. 1-4, 2016.

PANIKER, N. V.; SRIVASTAVA, S. K.; BEUTLER, E. 1970. Glutathione metabolism of the red cells. Effect of glutathione reductase deficiency on the stimulation of hexose monophosphate shunt under oxidative stress. **Biochim Biophys Acta**. V. 215, p 456–460, 1970.

PARK, B.; HWANG, E.; SEO, S. A.; CHO, J. G.; YANG, J. E.; YI, T. H. Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1. **Arch Biochem Biophys**. v.24, n. 639, p. 31-39, 2017.

PELIZZO, M.; ZATTRA, E.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; GAROLI, D.; ALAIBAC, M. *In Vitro* Evaluation of Sunscreens: An Update for the Clinicians. **ISRN Dermatol**. v.2012, n. 352135, p. 1-4, 2012.

PETERSEN, B.; WULF, H. C. Application of sunscreen--theory and reality. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**. v 30, n. 2-3, p. 96-101 2014.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian J Clin Biochem**. v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PHILIPS, N.; AULER, S.; HUGO, R.; GONZALEZ, S. Beneficial Regulation of Matrix Metalloproteinases for Skin Health. **Enzyme Res**. v. 2011, n. 427285, 2011.

PITTAS AG, HARRIS SS, STARK PC, DAWSON-HUGHES B. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. **Diabetes Care**. v. 30, p. 980–986, 2007.

PITTAYAPRUEK, P.; MEEPHANSAN, J.; PRAPAPAN, O.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. **Int J Mol.** v.7, n. 6, p. 868.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2017, p. 1-13, 2017.

POKORSKI, Mieczyslaw. *Advances in Clinical Science. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1a Ed. Opole: Springer, 2016.

POLEWSKIA, M. A.; KRUEGERAB, C. G.; REEDAB, J. D.; LEYERC, G. Ability of cranberry proanthocyanidins in combination with a probiotic formulation to inhibit in vitro invasion of gut epithelial cells by extra-intestinal pathogenic E. coli. **Journal of Functional Foods.** v. 25, p. 123-134, 2016.

POUR, N. S.; SAEEDI, M.; SEMNANI, M. K.; AKBARI, J. Sun Protection for Children: A Review. **J Pediatr Rev.** v. 3, n. 1, p.1-7, 2015.

PROST-SQUARCIONI, C.; FRAITAG, S.; HELLER, M.; BOEHM, N. Functional histology of dermis. **Ann Dermatol Venereol.** v. 135, n. 1-2, p. 1-16, 2008.

QUAN, T.; LITTLE, E.; QUAN, H.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Elevated Matrix Metalloproteinases and Collagen Fragmentation in Photodamaged Human Skin: Impact of Altered Extracellular Matrix Microenvironment on Dermal Fibroblast Function. **J Invest Dermatol.** v.133, n. 5, p. 1362-1366, 2016.

QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. **J Invest Dermatol.** v.14, n. 1, p. 20-24, 2009.

RAFIEEPOUR, A.; GHAMARI, F.; MOHAMMADBEIGI, A.; ASGHARI, M. Seasonal Variation in Exposure Level of Types A and B Ultraviolet Radiation: An Environmental Skin Carcinogen. **Ann Med Health Sci Res.** v.5, n.2, p.129-133, 2015.

RAHAL A, KUMAR A, SINGH V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging.** v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RAI, R.; SHANMUGA, S. C.; SRINIVAS, C. Update on Photoprotection. **Indian J Dermatol.** v. 57, n. 5, p. 335-342, 2012.

RANDHAWA, M.; SEO, I.; LIEBEL, F.; SOUTHALL, M. D.; KOLLIAS, N.; RUVOLO, E. Visible Light Induces Melanogenesis in Human Skin through a Photoadaptive Response. **PLoS ONE.** v. 10, n. 6, p. 1-14, 2016.

RASS, K.; REICHRATH, J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Adv Exp Med Biol.** v. 624, p. 162-178, 2008.

RASTRELLI, M.; TROPEA, S.; ROSSI, C. R.; ALAIBAC, M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo.** v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

RENA, S.; BYRNE, S. N.; MACDONALD, L. J.; CHAN, C.Y.; HALLIDAY, G.M. Ultraviolet B suppresses immunity by inhibiting effector and memory t cells. **Am J Pathol.** v. 17, n.4, p. 993-1004, 2008.

RIDKY, T. W. Non-melanoma skin cancer. **J Am Acad Dermatol.** v. 57, p. 484–501, 2007.

RIGEL, Darrel S. *Cancer of the skin.* 2a Ed. Utah: Elsevier, 2011.

RIVAS, M.; ROJAS, E.; ARAYA, M.C.; CALAF, G. M. Ultraviolet light exposure, skin cancer risk and vitamin D production. **Oncol Lett.** v.10, p. 2259-2264, 2015.

RIVLIN, N.; BROSH, R.; OREN, M.; ROTTER, V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes Cancer.** v.2, n. 4, p. 466-474, 2011.

ROCHETTE, P. J.; THERRIEN, J. P.; DROUIN, R.; PERDIZ, D.; BASTIEN, N.; DROBETSKY, E. A.; SAGE, E. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. **Nucleic Acids Res.** v.31, p. 2786-2794, 2003.

ROGERS, H. W.; WEINSTOCK, M. A.; FELDMAN, S. R.; COLDIRON, B. M. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer (Keratinocyte Carcinomas) in the U.S. Population, 2012. **JAMA Dermatol.** v. 151, n. 10, p. 1081-1086, 2015.

ROMANOVSKY, A. A. Skin temperature: its role in thermoregulation. **Acta Physiol (Oxf).** v. 210, n. 3, p. 498-507, 2014.

RUEL, G.; POMERLEAU, S.; COUTURE, P.; LAMARCHE, B.; COUILLARD, C. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. **Metabolism**. v. 54, p. 856–861, 2005.

RUVOLO, J. E.; KOLLIAS, N.; COLE, C. New noninvasive approach assessing *in vivo* sun protection factor (SPF) using diffuse reflectance spectroscopy (DRS) and *in vitro* transmission. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**. v. 30, n. 4, p. 202-211, 2014.

SAGE, E.; GIRARD, P. M.; FRANCESCONI, S. Unraveling UVA-induced mutagenesis. **Photochem Photobiol Sci**. v. 11, n.1, p. 74-80, 2012.

SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synth Syst Biotechnol**. v. 2, n. 1, p. 13-22, 2017.

SÁNCHEZ, G.; NOVA, J.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A. E.; MEDINA, R.D.; SOLORZANO-RESTREPO, C.; GONZALEZ, J.; OLMOS, M.; GODFREY, K.; AREVALO-RODRIGUEZ, I. Sun protection for preventing basal cell and squamous cell skin cancers. **Cochrane Database Syst Rev**. v. 25, n. 7, 2017.

SAYRE, R. M.; AGIN, P.P.; LEVEE, G.J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formula. **Photochem. Photobiol**. v. 29, p. 559-566. 1979.

SCALIA S.; MEZZENA, M.; BIANCHI, A. Comparative evaluation of different substrates for the *in vitro* determination of sunscreen photostability: spectrophotometric and HPLC analyses. **Int J Cosmet Sci**. v. 32, n. 1, p. 55-64, 2010.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Sun protection factor: meaning and controversies. **An Bras Dermatol**. v. 86, n. 3, p. 507-515, 2011.

SCHALKA, S.; STEINER, D.; RAVELLI, F. N.; STEINER, T.; COBÉRIO, T. A.; MARÇON, C. R.; AYRES, E. L.; ADDOR, F. A. S.; MIOT, H. A.; PONZIO, H.; DUARTE, I.; NEFFÁ, J.; CUNHA, J. A. J.; BOZA, J. C.; SAMORANO, L. DE P.; CORRÊA, M. P.; MAIA, M.; NASSER, N.; LEITE, O. M. R. R.; LOPES, O. S.; OLIVEIRA, P. D.; MEYER, R. L. B.; CESTARI, T.; REIS, V. M. SILVA DOS, REGO, V. R. P. A. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An Bras Dermatol**. v.89, n. 6, p. 1-75, 2014.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M.; GARCIA, C. C. M. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radic Biol Med**. v. 107, p. 110-124, 2017.

SCHWARZ, T. 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells from disregarded T suppressor cell to highly respected regulatory T cells. **Photochem Photobiol**. v. 84, n.1, p. 10-18, 2008.

SEEDS, Michael. A.; BACKMAN, Dana. *Foundations of Astronomy*. 13 Ed. Connecticut: Cengage Learning, 2007.

SELYE, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. **Br Med J**. v.1, n. 4667, p. 1383-92, 1950.

SHAATH, Nadim A. *The encyclopedia of ultraviolet filters*. 1a Ed. Nova Iorque: Allured Publishing Corporation; 2007.

SHEU, M. T.; LIN, C. W.; HUANG, M. C.; SHEN, C. H. HO, H. Correlation of In vivo and In vitro Measurements of Sun Protection Factor. **J Food Drug Anal**. v. 11, n. 2, p. 128-132, 2003.

SHIREEN, P. M.; MUJEEB, AV. V. M.; MURALEEDHARAN, K. Theoretical insights on flavanones as antioxidants and UV filters: A TDDFT and NLMO study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 170, p. 286-294, 2017.

SHOURIE, A.; TOMAR, P.; SRIVASTAVA, D.; CHAUHAN, R. Enhanced biosynthesis of quercetin occurs as A photoprotective measure in *Lycopersicon esculentum* mill. under Acute UV-B exposure. **Braz arch biol technol**. v. 57, n.3 p.317-325, 2014.

SIES, H (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In **Oxidative Stress**, ed. H Sies, pp. 1–8. London: Academic.

SILVA, J. P.; COUTINHO, O. P. Free radicals in the regulation of damage and cell death - basic mechanisms and prevention. **Drug Discov Ther**. v. 4, n. 3, p. 144-67, 2010.

SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GREEN KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 12, n. 9, p.565-580, 2011. doi:10.1038/nrm3175.

SINGH, L. C. G. K. High Altitude Dermatology. **Indian J Dermatol**. v. 62, n.1, p. 59-65, 2017.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **Int J Mol Sci**. v. 16, n. 10, p. 24673–24706, 2015.

SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SOCHOR, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. **Int. J. Mol. Sci**. v. 16, p. 24673-24706, 2015.

SLINEY, D H. What Is Light? The Visible Spectrum and beyond. **Eye**. v.30, n.2, p 222–229, 2016.

SOHN, M.; MALBURET, C.; BAPTISTE, L.; PRIGL, Y. Development of a Synthetic Substrate for the in vitro Performance Testing of Sunscreens. **Skin Pharmacol Physiol**. v. 30, n. 3, p. 159-170, 2017.

SOUSA, R. Ser ou não ser [Zoela], eis a questão...in: Cadernos Terras Quentes. p. 17-25, 2011.

SOUZA, R. J. S. P.; CORRÊA, M. P.; FERREIRA, A. C. A.; MATTEDI, A. P.; REZENDE, M. L. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no Estado de São Paulo – Brasil. **An Bras Dermatol**. v. 86, n. 4, p. 657-662, 2011.

STALLINGS, F.; LUPO, M. P. Practical Uses of Botanicals in Skin Care. **J Clin Aesthet Dermatol**. v. 2, n. 1, p. 36–40, 2009.

STAPLETON, A. E.; WALBOT, V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. **Plant Physiology**. V.105, n. 3, p. 881-889, 1994.

STEJNBORN, A. S.; BASTA, P.; TRZECIAK, J.; MICHALSKA, A.; KAFKAS, E. M.; ŚLUBOWSKA, D. W. Effects of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) supplementation on iron status and inflammatory markers in rowers. **J Int Soc Sports Nutr**. v. 14, n. 7, p 1-10, 2017.

SUGAWARA, T.; IWAMOTO, N.; AKASHI, M.; KOJIMA, T.; HISATSUNE, J.; SUGAI, M.; FURUSE, M. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. **J Dermatol Sci**. v.70, n.1, p.12-18, 2013.

SUN, J.; MARAIS, J. P.; KHOO, C.; LAPLANTE, K.; VEJBORG, R. M.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; SEERAM, N. P.; ROWLEY, D. C. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. **J Funct Foods**. v.17, p. 235-242, 2015.

Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Final Monograph; Extension of Effective Date; Reopening of Administrative Record, 65 Fed. Reg. 26319 (June 8, 2000); Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Final Monograph; Partial Stay; Final Rule, 66 Fed. Reg. 67485 (Dec. 21, 2001).

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “Letter” to the Editor of Nature. **Stress**. v. 15, n. 5, p. 472-478, 2012.

TADOKORO, T.; YAMAGUCHI, Y.; BATZER, J.; COELHO, S. G.; ZMUDZKA, B. Z.; MILLER, S. A.; WOLBER, R.; BEER, J. Z.; HEARING, V. J. Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. **J Invest Dermatol.** v. 124, n. 6, p.1326-1332, 2005.

TERUYA, N.; DUARTE, S. B. Núcleos exóticos e síntese dos elementos químicos. **Quím Nova.** v.35, n.2, 2012.

THEIL, A. F.; NONNEKENS, J.; WIJGERS, N.; VERMEULEN, W.; GIGLIA-MARI, G. Slowly Progressing Nucleotide Excision Repair in Trichothiodystrophy Group A Patient Fibroblasts. **Mol Cell Biol.** v. 31, n. 17, p. 3630-3638, 2011.

THIESEN, L.; BACCARIN, T.; FISCHER-MULLER, A. F.; MEYRE-SILVA, C.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M.; SANTIN, J. R. Photochemoprotective effects against UVA and UVB irradiation and photosafety assessment of Litchi chinensis leaves extract. **J Photochem Photobiol B.** v. 167, p. 200-207, 2017.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan. *Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.* 14a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

TOSINI, G.; FERGUSON, I.; TSUBOTA, K. Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. **Mol Vis.** v. 22, p.61-72, 2016.

TRAN, T. N., SCHULMAN, J., & FISHER, D. E. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. **Pigment Cell Melanoma Res.** v. 21, n. 5, p. 509–516, 2008.

TROJAHN, C.; DOBOS, G.; LICHTERFELD, A.; BLUME-PEYTAVI, U.; KOTTNER J. Characterizing Facial Skin Ageing in Humans: Disentangling Extrinsic from Intrinsic Biological Phenomena. **Biomed Res Int.** v.2015, n.318586, 2015.

TSANG, A. H.; ASTIZ, M.; FRIEDRICHS, M.; OSTE, H. Endocrine Regulation of Circadian Physiology. **J Endocrinol.** v. 230, n. 1, p. 1-11, 2016.

UĞURLU, Z.; İŞİK, S. A.; BALANUYE, B.; BUDAK, E.; ELBAŞ, N.; KAV, S. Awareness of Skin Cancer, Prevention, and Early Detection among Turkish University Students. **Asia Pac J Oncol Nurs.** v. 3, n. 1, p. 93-97, 2016.

ULRICH, S. E. Sunlight and skin cancer: lessons from the immune system. **Mol Carcinog.** v. 46, n.8, p. 629-633, 2007.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **J Photochem Photobiol B**. v. 15, n. 64, p. 99-104, 2001.

VAID, M.; PRASADA, R.; SINGHA, T.; ELMETS, C. A.; XUA, H.; KATIYAR, S. Silymarin inhibits ultraviolet radiation-induced immune suppression through DNA repair-dependent activation of dendritic cells and stimulation of effector T cells. **Biochem Pharmacol**. v. 85, n.8, p. 1066-1076, 2013.

VALKO, M.; JOMOVA, K.; RHODES, C. J.; KUČA, K.; MUSÍLEK, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. **Arch Toxicol**. v. 90, n. 1, p.1-37.

VANCHINATHAN, V.; LIM, H. W. A Dermatologist's Perspective on Vitamin D. **Mayo Clin Proc**. v. 87, n.4, p. 372-380, 2012.

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, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASILEIOU, I.; KATSARGYRIS, A.; THEOCHARIS, S.; GIAGINIS, C. Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. **Nutr Res**. v. 33, p. 595–607, 2013.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.

VERSCHOOTEN, L.; DECLERCQ, L.; GARMYN, M. Adaptive response to UVB damage: role of p53 protein. **Int J Cosmet Sci**. v. 28, p. 1-7, 2006.

VINSON, J. A.; BOSE, P.; PROCH, J.; KHARRAT, H. A.; SAMMAN, N. Cranberries and cranberry products: powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants. **J Agric Food Chem**. v. 56, p.5884–5891, 2008.

VO, T. H. N.; TRAN, N.; NGUYEN, D.; LE, L. An in silico study on antidiabetic activity of bioactive compounds in *Euphorbia thymifolia* Linn. **Springer Plus**. v. 5, n. 1359, p. 1-13, 2016.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. **Dermatoendocrinol**. v.5, n. 1, p. 51-108, 2013.

WANG, C. H.; FANG, C. C.; CHEN, N. C.; LIU, S. S.; YU, P. H.; WU, T. Y.; LEE, C.; C.; CHEN, S. C. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Arch Intern Med.** v. 172, p. 988–996, 2012.

WANG, T. J.; PENCINA, M. J.; BOOTH, S. L.; JACQUES, P. F.; INGELSSON, E.; LANIER, K.; BENJAMIN, E.J.; D'AGOSTINO, R.B.; WOLF, M.; VASAN, R. S. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. **Circulation.** v. 117, n. 4, p. 503-511, 2008.

WANG, Z.; LI, J.; CHEONG, S.; BHASKAR, U.; AKIHIRO, O.; ZHANG, F.; DORDICK, J. S.; LINHARDTA, R. J. Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin. **J Biotechnol.** v. 156, n. 3, p. 188–196, 2011.

WANI, T. A.; AHMAD, A.; ZARGAR, S.; KHALIL, N. Y.; DARWISH, I. A. Use of response surface methodology for development of new microwell-based spectrophotometric method for determination of atrovastatin calcium in tablets. **Chem Cent J.** v. 6, n. 134, 2012.

WE, R. Skin type classification systems old and new. **Dermatol Clin.** v. 27, n. 4, p. 529-533, 2009.

WEATHERHEAD, S. C.; FARR, P. M.; REYNOLDS, N. J. Spectral effects of UV on psoriasis. **Photochem Photobiol Sci.** v. 12, n. 1, p. 47-53, 2013.

WESTGARD, J. O.; LOTT, J. A. Precision and Accuracy: Concepts and Assessment by Method Evaluation Testing. **Critic Rev Clin Lab Sci.** v. 13, n. 4, p. 283-330, 1981.

WHITE, B. L.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Impact of different stages of juice processing on the anthocyanin, flavonol, and procyanidin contents of cranberries. **J Agric Food Chem.** v. 59, p. 4692–4698, 2011.

WICKS, N. L.; CHAN, J. W.; NAJERA, J. A.; CIRIELLO, J. M.; OANCEA, E. UVA Phototransduction Drives Early Melanin Synthesis in Human Melanocytes. **Curr Biol.** v. 21, n. 22, p.1906-1911, 2011.

WILSON, K. E.; THOMPSON, J. E.; HUNER, N. P.; GREENBERG, B. M. Effects of ultraviolet-A exposure on ultraviolet-B-induced accumulation of specific flavonoids in *Brassica napus*. **Photochem Photobiol.** v. 73, n. 6, p. 678-84, 2001.

WOLOSİK, K.; ZAREBA, I.; SURAZYNSKI, A.; MARKOWSKA, A. The Possible Pre- and Post-UVA Radiation Protective Effect of Amaranth Oil on Human Skin Fibroblast Cells. **Pharmacogn Mag.** v.13, n. 2, 2017.

WOLPERT, S. Sun's core rotates four times faster than its surface. Disponível em: <https://phys.org/news/2017-08-sun-core-rotates-faster-surface.html>. Acesso em: 29/10/2017.

XIAO, S. D.; SHI, T. Is cranberry juice effective in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection of mice? **Chin J Dig Dis**. v. 4, p. 136–139, 2003.

XIAOJUN, Y.; MURPHY, B. T.; HAMMOND, G. B.; VINSON, J. A.; NETO, C. C. Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). **J. Agric. Food Chem**. v. 50, p. 5844–5849, 2002.

XIN QU, XIAOMIN ZHAO, and ZHIHUA. A new in vitro method to determine sun protection factor. **J Soc Cosmetic Chem**. v. 67, n. 2, p. 101-111, 2016.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J. Melanocytes and Their Diseases. **Cold Spring Harb Perspec Med**. v. 4, n. 5, p. 1-18, 2014.

YOSHIDA, K.; KUBO, A.; FUJITA, H.; YOKOUCHI, M.; ISHII, K.; KAWASAKI, H.; NOMURA, T.; SHIMIZU, H.; KOUYAMA, K.; EBIHARA, T.; NAGAO, K.; AMAGAI, M. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**. v.134, n. 4, p.856-864, 2014.

YOUNG, A. R.; BOLES, J.; HERZOG, B.; OSTEWALDER, U.; BASCHONG, W. A sunscreen's labeled sun protection factor may overestimate protection at temperate latitudes: a human *in vivo* study. **J Investigative Dermatol**. v. 130, p. 2457-2462, 2010.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **J Am Acad Dermatol**. v. 76, N. 3, 2017.

YU, S. L.; LEE, S. K. Ultraviolet radiation: DNA damage, repair, and human disorders. **Mol Cell Toxicol**. v. 13, n. 1, p. 21-28, 2017.

YU, X-L.; HE, Y. Application of Box-Behnken designs in parameters optimization of differential pulse anodic stripping voltammetry for lead(II) determination in two electrolytes. **Sci Rep**. v.7, n.2789, p. 1-7, 2017.

ZAIDI, Z.; LANIGAN, S.W. (2010) Skin: Structure and Function. In: *Dermatology in Clinical Practice*. 1a Ed. London: Springer, 2010.

ZBYTEK, B.; CARLSON, J. A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHM, M. C.; SLOMINSKI, A. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Rev Dermatol**. v. 3, n. 5, p.569-585, 2008.

ZEMAN, M. K.; CIMPRICH, K. A. Causes and Consequences of Replication Stress. **Nat Cell Biol** v. 16, n. 1, p. 2-9, 2014.

ZHU, X.; LI, N.; WANG, Y.; DING, L.; CHEN, H.; YU, Y.; SHI, X. Protective effects of quercetin on UVB irradiation-induced cytotoxicity through ROS clearance in keratinocyte cells. **Oncol Rep.** v. 37, n. 1, p. 209-218, 2017.

ZHU, Y.; XIA, M.; YANG, Y.; LIU, F.; LI, Z.; HAO, Y.; MI, M.; JIN, T.; LING, W. Purified anthocyanin supplementati on improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem.** v. 57, p. 1524–1533, 2011.