UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de novos filtros solares derivados de benzofenona-3:
estudo da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante**

MARÍA TERESA PÁEZ GONZÁLEZ

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de novos filtros solares derivados de benzofenona-3:
estudo da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): María Teresa Páez González
Orientador(a): Profa. Dra. Lorena Rigo
Gaspar Cordeiro

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em 20/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2014

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

González, María Teresa Páez

Desenvolvimento de novos filtros solares derivados de benzofenona-3: estudo da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante. Ribeirão Preto, 2014

91 p.: il 30cm.

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

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar

1. Filtros Solares 2. Radiação UV 3. Fotoestabilidade
4. Fototoxicidade 5. Benzofenona-3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: María Teresa Páez González

Título do trabalho: Desenvolvimento de novos filtros solares derivados de benzofenona-3: estudo da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar
Cordeiro.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A **Dios**, por estar conmigo en cada paso, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

A mis queridos padres **Lilia y José**, por su gran esfuerzo y apoyo. De no haberlos tenido a mi lado, aunque fuera en la distancia, nada de esto hubiese sido posible.

A mi hermano **Juan**, por el apoyo, el incentivo, la amistad, las risas y el amor verdadero.

A mi hermano **Carlos**, porque además me mostró la realidad de la vida.

A mis **amigos**, porque aquí y en la distancia siempre me apoyaron incondicionalmente, **Luis, Esmeralda, Jeni, Julian, Susana, Jorge y Elizabeth**.

A la **vida**, que me ha dado tanto, me dio dos luceros que cuando los abro, perfecto distingo lo negro del blanco...

E, a **todas as pessoas** que estiveram do meu lado.

GRACIAS TOTALES....

Agradecimento especial

À minha orientadora, Profa. Dra, Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, por acreditar em mim, pelo apoio, dedicação, orientação e principalmente e pela oportunidade, que me permitiu realizar este sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Dr. Flavio da Silva Emery**, pelo apoio e orientações e por permitir desenvolver a parte sintética do meu projeto no seu laboratório.

Aos meus amigos do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM), pelo apoio, as risadas, as orientações e principalmente pela amizade, **Fernando, Lucas, Luciana, Shaiani, Rodrigo, Miguel, Eder, Paulo, Murilo e Marcia**.

Às minhas amiguinhas e coleguinhas do laboratório tecnologia de cosméticos (Tecnoprot) pelo apoio e colaboração em muitas das minhas atividades, **Juliana, Karina, Bianca, Natalia, Renata, Camila e Carolina**.

À Professora Dra. **Yara Maria Lucisano Valim**, pela concessão do uso de materiais e equipamentos para a realização dos ensaios de atividade antioxidante.

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

Às professoras Dra. **Patricia Maria Berardo Gonçalves Maia Campos**, Dra. **Rose Mary Zumstein Georgetto Naal** e Dra. **Karina Dias**, pelas correções e sugestões feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana dos Santos Florêncio**, e, por toda a ajuda a realização deste trabalho.

A todos os **professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram para a minha formação.

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

A **todos** os que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** e o **CNPq**, pelo apoio financeiro.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas "Graças a Deus, não sou o que era antes".

Martin Luther King

RESUMO

GONZÁLEZ, M.T.P. **Desenvolvimento de novos filtros solares derivados de benzofenona-3: estudo da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante.** 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O aumento do conhecimento em relação aos danos provocados pela radiação solar, tanto na faixa do UVB quanto na faixa do UVA, o avanço nas tecnologias relacionadas ao produto e às formas de avaliação bem como a disponibilização de novas moléculas no mercado levaram ao aumento da qualidade da proteção proporcionada pelos fotoprotetores. Entretanto, ainda há preocupações em relação à segurança de alguns filtros solares devido a sua fotoinstabilidade e penetração cutânea. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos filtros solares mais efetivos e seguros, que apresentem relevância científica e potencial de inovação. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo desenvolver novos análogos ao filtro solar benzofenona-3 e determinar o seu potencial fotoprotetor por meio da avaliação da absorção UV e avaliação da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante. Para tal, inicialmente seis análogos ao filtro solar químico benzofenona-3 foram sintetizados visando aumentar o tamanho da molécula e aumentar a sua absorção no UVA longo (340-400nm). Foram avaliados os espectros de absorção no UV e a fotodegradação dessas substâncias. A fototoxicidade das substâncias selecionadas foi avaliada por meio do uso de cultura de fibroblastos 3T3, para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência da radiação. A atividade antioxidante das substâncias foi avaliada por meio da quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol. Os resultados permitiram demonstrar a importância da relação entre a estrutura molecular dos compostos e sua absorção no UV. As moléculas benzofenona-3 fenil amino (B5) e o carbazol da benzofenona-3 fenil amino (B6) apresentaram maior absorção no UVA, longo e curto, e no UVB, quando comparadas com a molécula de partida (benzofenona-3). Apenas as substâncias que apresentavam ponte de hidrogênio intramolecular (B5 e B6) foram consideradas fotoestáveis. Somente a molécula B5 não apresentou potencial para fototoxicidade aguda. Além disso, essa molécula apresentou atividade antioxidante, o que sugere o seu grande potencial para utilização com filtro solar.

Palavras chave: filtros solares, radiação UV, fotoestabilidade, fototoxicidade, benzofenona-3.

ABSTRACT

GONZÁLEZ, M.T.P. **Development of new benzophenone-3 UV-filters derivatives: study of the photostability, phototoxicity and antioxidant activity.** 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The increase of our knowledge of not only UVB but also UVA-induced damages, the advances on product and testing technologies as well as new sunscreen molecules led to and enhancement of quality of UV protection provided by topical sunscreens. However there are some safety concerns involving some UV-filters due to their photoinstability and skin penetration. Therefore it is necessary to develop new safer and more effective UV-filters, which also presents scientific relevance and innovation potential. Thus, the aim of the present research was to develop new analogues based on benzophenone-3, and to evaluate their photoprotective potential through their photostability, phototoxicity and antioxidant activity. For this purpose, firstly six new synthetic analogues based on benzophenone-3 were prepared in order to promote molecular weight enhancement as well as improve long-wave UVA absorption (340-400 nm). The UV absorption spectra and photodegradation of these compounds were also analyzed. Phototoxicity of selected compounds was evaluated by using 3T3 monolayer fibroblast culture to determine cell viability in the presence and absence of UVA radiation. The antioxidant activity was evaluated by HRP-H₂O₂-luminol induced chemiluminescence. The results showed that relationship between the molecular structure and UV absorption. Me molecules phenylamine benzophenone-3 (B5) and phenylamine benzophenone-3 carbazol (B6) showed higher short and long-wave UVA and UVB absorption, when compared to benzophenone-3. Only B5 and B6, which presented intermolecular hydrogen bond, were considered photostable. B5 did not present any acute phototoxicity potential; in addition it has antioxidant activity, which suggests its high UV-filter potential.

Keywords: UV-filters, UV radiation, photostability, phototoxicity, antioxidant activity, benzophenone-3

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1-	Deslocalização eletrônica do ácido para-amino benzoico.....	10
Esquema 2-	Deslocalização eletrônica dos salicilatos.....	11
Esquema 3-	Delocalização eletrônica dos cinamatos	12
Esquema 4-	Tautomerismo da benzofenona-3	12
Esquema 5-	Tautomerismo da avobenzona	13
Esquema 6-	Síntese para obtenção da benzofenona-3 triflato, (B2).....	25
Esquema 7-	Síntese do formiato de benzofenona-3, (B3)	25
Esquema 8-	Retrossíntese da benzofenona (B4)	26
Esquema 9-	Síntese da alfa-tocoferamina, (T4)	26
Esquema 10-	Síntese da benzofenona-3 fenilamino, (B5)	28
Esquema 11-	Síntese do carbazol da benzofenona-3 fenilamino, (B6).....	28
Esquema 12-	Síntese do aduto de benzofenona-3 com o succinato de alfa-tocoferol, (B7).....	28
Esquema 13-	Síntese do succinato de alfa-tocoferol, (T5).....	29
Esquema 14-	Esquema simplificado da produção de quimioluminescência pela reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol	36
Esquema 15-	Mecanismo de reação de substituição nucleofílica bimolecular	38
Esquema 16-	Mecanismo da reação Buchwald-Hartwig e Heterociclicização para formação dos compostos B5 e B6	39
Esquema 17-	Ressonância entre a hidroxila e a carbonila.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura1-	Representação das camadas da pele	8
Figura 2 -	Fórmula estrutural do metoxicinamato de etilexila	11
Figura 3 -	Fórmula estrutural da metibenzilideno cânfora	12
Figura 4-	Estrutura da benzofenona-3	13
Figura 5 -	Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade	34
Figura 6 -	Estrutura da molécula da benzofenona-3 para análise dos resultados obtidos (B1)	40
Figura 7 -	Estrutura da molécula do alfa-tocoferol (T1)	40
Figura 8 -	Estrutura da molécula de triflato de benzofenona-3 (B2)	41
Figura 9 -	Estrutura da molécula de Formiato de benzofenona-3 (B3)	42
Figura 10 -	Estrutura da molécula de benzofenona (B4)	43
Figura 11 -	Estrutura da molécula de benzofenona-3 fenil amino (B5)	45
Figura 12 -	Estrutura da molécula do carbazol da benzofenona-3fenil amino (B6)	46
Figura 13 -	Estrutura da molécula do aduto de benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (B7)	47
Figura 14 -	Estrutura da molécula do succinato de alfa-tocoferol (T5)	48
Figura 15 -	Estrutura do cromóforo de benzofenona	49
Figura 16 -	Espectro de absorção no UV para as soluções 1,5 µM em isopropanol	50
Figura 17 -	Avaliação do efeito dos solventes sobre as substâncias com absorção no UVA. Benzofenona-3	52
Figura 18 -	Avaliação da fotoestabilidade. Espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA e do UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação	56
Figura 19 -	Curva dose resposta das substâncias em estudo	59
Figura 20 -	Atividade antioxidante em função da concentração dos padrões (P1, P2 e P3) e dos derivados de benzofenona-3 (B1, B5 e B6)	63
Figura 21 -	Moléculas obtidas no desenvolvimento do projeto	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de acordo com o Boot's Star System da proteção UVA oferecida pelo fotoprotetor com base na razão UVA/UVB	31
Tabela 2 -	Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção e a razão UVA/UVB.....	32
Tabela 3 -	Rendimento e características das substâncias obtidas.....	39
Tabela 4 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B1	40
Tabela 5 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de T1	41
Tabela 6 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B2	42
Tabela 7 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B3	43
Tabela 8 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN e espectrometria de massas) de B4	44
Tabela 9 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B5	45
Tabela 10 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B6	46
Tabela 11 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de B7	47
Tabela 12 -	Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de T5	48
Tabela 13 -	Avaliação do efeito dos substituintes no espectro de absorção ultravioleta na molécula de benzofenona-3.....	50
Tabela 14 -	Coeficientes de absortividade molar para a benzofenona-3 (B1) em diferentes solventes	53
Tabela 15 -	Coeficientes de absortividade molar para a benzofenona-3 fenilamino (B5) em diferentes solventes	53
Tabela 16. -	Coeficientes de absortividade molar para o carbazol da benzofenona-3 fenilamino (B6) em diferentes solventes	53
Tabela 17 -	Avaliação da absorção UVA das moléculas sintetizadas. A categoria e o nível de proteção estão baseados no Sistema Boot's Star Rating	54
Tabela 18 -	Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA e do UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação	55
Tabela 19 -	Sensibilidade dos fibroblastos a radiação UVA.....	57

Tabela 20 -	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N = 2)	58
Tabela 21 -	Porcentagem de inibição ou aumento da quimioluminescência gerada pela reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol (QLHRP), na presença de 500 µmol/L dos derivados de benzofenona-3	62
Tabela 22 -	Concentração dos análogos de benzofenona-3 que promoveu 50% de inibição (CI50) da QLHRP (quimioluminescência produzida pela reação HRP-H ₂ O ₂ -luminol).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg/mL	Microgramas/mililitros
µl	Microlitros
3T3 NRU PT	Teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVZ	Avobenzona
BZF-3	Benzofenona-3
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cm	Centímetro
Dm	Decímetro
DME	Dose mínima eritematosa
DMEp	Dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
IC50	Concentração de uma substância que inibe 50% da viabilidade celular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FPS	Fator de proteção solar
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	International Nomenclature of Cosmetics Ingredients
INN	International Nonproprietary Names
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
J	Joule

Min	minutos
mL	Mililitros
mol	Mol
MPE	Mean photo effect
mW	Miliwatts
NaOH	Hidroxido de Sódio
NaHCO ₃ ,	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetros
OECD	Organisation for economic co-operation and development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PIF	Photo irritation factor
PM	Peso molecular
Ppm	parte por milhão
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
S0	Estado fundamental eletrônico
S0*	Estado fundamental com energia vibracional
S1	Primeiro estado excitado eletrônico
T1	Estado excitado tripleto
THF	Tetrahidrofurano
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Volume/volume
W	Watts

LISTA DE SIMBOLOS

X	Média
E	Isômero TRANS
n°	Número
S	Desvio padrão
Z	Isômero CIS
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ESQUEMAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE SIMBOLOS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Pele e a radiação solar	8
2.2 Fotoprotetores	9
2.3 Avaliação da performance de fotoprotetores	14
2.3.1 Fotoestabilidade.....	14
2.3.2 Avaliação da eficácia de fotoprotetores.....	15
2.3.3 Avaliação da fototoxicidade	16
2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	17
2.4 Técnicas de análise	18
2.4.1 Espectroscopia de RMN	18
2.4.2 Espectrometria de massas	19
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Materiais	23
4.1.1 Solventes e reagentes.....	23
4.1.2 Equipamentos e acessórios	24
4.2 Métodos	24
4.2.1 Métodos de síntese	25
4.2.1.1 Triflato de benzofenona-3 (B2)	25
4.2.1.2 Formiato de benzofenona-3 (B3).....	26
4.2.1.3 Benzofenona (B4).....	26
4.2.1.4 Benzofenona-3 fenilamino (B5)	28
4.2.1.5 Carbazol da benzofenona-3 Fenilamino (B6).....	28
4.2.1.6 Aduto de benzofenona-3 com o succinato de alfa-tocoferol (B7).....	29

4.2.2 Caracterização das moléculas	30
4.2.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada.....	30
4.2.2.2 Espectroscopia de ¹ H RMN	30
4.2.2.3 Espectrometria de Massas	31
4.2.3 Avaliação da performance	31
4.2.3.1 Absorção no ultravioleta e avaliação da eficácia.....	31
4.2.3.2 Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV	32
4.2.3.2.1 Análise estatística	33
4.2.3.3 Avaliação da fototoxicidade	33
4.2.3.3.1 Linhagem celular de fibroblastos 3T3	33
4.2.3.3.2 Fototoxicidade em cultura de fibroblastos	34
4.2.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante (HRP-H ₂ O ₂ -luminol.).....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Mecanismos de reação.....	39
5.1.1 Reação Substituição Nucleofílica seguida de Eliminação.....	39
5.1.2 Reação de acoplamento cruzado (Buchwald-Hartwig) e Ativação C-H (Heterociclicização de Åkermark-Knölker)	39
5.2 Caracterização estrutural dos compostos.....	40
5.2.1 Triflato de Benzofenona-3 (B2)	42
5.2.2 Formiato de Benzofenona-3 (B3).....	43
5.2.3 Benzofenona (B4).....	44
5.2.4 Benzofenona-3 Fenil amino (B5)	46
5.2.5 Carbazol da Benzofenona-3 Fenil amino (B6).....	47
5.2.6 Aduto de Benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (B7)	48
5.3 Determinação do espectro de absorção no ultravioleta	50
5.3.1 Avaliação do efeito dos substituintes na absorção ultravioleta	50
5.3.2 Avaliação da absorção no UVA	55
5.4 Avaliação da fotoestabilidade.....	56
5.5 Avaliação da fototoxicidade	58
5.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	62
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8 ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

O nível de qualidade da proteção proporcionada pelos fotoprotetores melhorou consideravelmente nas últimas décadas. Esse aumento ocorreu devido ao aumento do conhecimento em relação aos danos provocados pela radiação solar, tanto na faixa do ultravioleta B quanto na faixa do ultravioleta A, ao avanço nas tecnologias relacionadas ao produto e às formas de avaliação bem como devido à disponibilização de novas moléculas e tecnologias no mercado (Osterwalder e Herzog, 2010; Jansen *et al.*, 2013).

Em relação ao conhecimento sobre os efeitos da radiação solar, atualmente, sabe-se que a radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol é responsável por diversos efeitos danosos sobre a pele, os quais se manifestam sob a forma de eritema ou queimadura solar, fotoenvelhecimento, lesões cancerosas e pré-cancerosas, entre outras (Litvinov *et al.*, 2010).

O espectro solar da radiação UV compreende os comprimentos onda que variam entre 200 e 400 nm, sendo que a faixa de 290 e 320 nm corresponde à radiação UVB e a faixa 320 e 400 nm à UVA. A radiação UVB é capaz de induzir efeitos biológicos adversos direta e indiretamente, incluindo estresse oxidativo, danos ao DNA, envelhecimento precoce da pele e múltiplos efeitos sobre o sistema imune, que juntos têm importante papel na geração e manutenção de neoplasmas induzidos por raios UV (Nichols e Katiyar, 2010).

Os raios UVA são capazes de penetrar profundamente a derme, sendo que a exposição ao UVA induz à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais hidroxil livres, o que pode causar danos às macromoléculas celulares, como proteínas, lipídeos e DNA. Ele ainda é relatado como um agente genotóxico capaz de produzir mutações em células humanas normais, sendo que deve ser considerado um potencial agente cancerígeno, além de estar relacionado ao fotoenvelhecimento e à diminuição da hidratação e elasticidade da pele (Nichols e Katiyar, 2010).

Os eventos cutâneos induzidos pela exposição aos raios UV são consequências diretas da absorção de fótons pelo DNA celular, e do estresse oxidativo provocado por várias reações indiretas ligadas à absorção de radiação UV pelos cromóforos celulares. O estresse oxidativo ocorre devido à produção de EROs, os quais levam à lipoperoxidação de membranas e também à formação de produtos de fotooxidação dentro do DNA (Césarini *et al.*, 2003).

Tendo em vista os fatos citados acima, bem como a crescente incidência de casos de câncer de pele na população e de outras manifestações decorrentes dos efeitos dos raios UV sobre a pele, o uso de filtros solares tem se tornado cada vez mais importante e necessário para prevenir ou reduzir a extensão dos danos provocados pela exposição à radiação UV. Além disso, uma vez que o UVA produz EROs por meio da interação com agentes fotossensibilizantes exógenos (Fourtanier, Moyal e Seite, 2008), torna-se de grande

importância o desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro e com alta proteção não somente contra a radiação UVB mas também contra a radiação UVA.

Inicialmente, os fotoprotetores desenvolvidos levavam em consideração apenas a proteção contra a radiação UVB, uma vez que ela é a responsável pela queimadura solar. Isso levava a população a permanecer mais tempo no sol e à falsa afirmação de que o aumento do uso de fotoprotetores promovia, ao invés de reduzir, os casos de câncer de pele (Haywood *et al.*, 2003; Osterwalder e Herzog, 2010).

Apesar dos formuladores contarem com um grande número de filtros solares UVB, há poucos filtros solares UVA disponíveis no mercado, sendo que a avobenzona, também conhecida como butilmetoxi dibenzoilmetano, tem sido o mais utilizado. Um aspecto importante relacionado à avobenzona é que essa molécula apresenta tautomerização ceto-enólica. Em uma solução, há um equilíbrio entre os dois tautômeros, entretanto ao sofrer irradiação, o equilíbrio é deslocado em favor da formação da forma ceto. A forma enólica da avobenzona possui uma alta absorção na faixa de 340 a 350 nm, entretanto, a forma ceto, apresenta alta absorção na faixa do UVC e baixo efeito protetor frente ao UVA e ainda pode sofrer processos de fotodegradação irreversíveis, tais como fragmentação e formação de fotoprodutos (Damiani *et al.*, 2006; Mturi e Martincigh, 2008; Paris *et al.*, 2009).

Há ainda vários questionamentos relacionados à segurança de uso de fotoprotetores, relacionados a absorção sistêmica dos filtros solares, acúmulo dessas moléculas no organismo e efeito estrogênico, uma vez que, quando utilizados em atividades recreacionais, os fotoprotetores são aplicados em uma grande extensão do corpo e, ainda, estão presentes em uma grande parte de produtos hidratantes e anti-envelhecimento de uso diário (Gustavsson Gonzalez, Farbrot e Larko, 2002; Nash, 2006).

Nos últimos anos, vários estudos relacionados ao efeito estrogênico de alguns filtros solares têm sido publicados, o que tem aumentado a preocupação com o risco à saúde humana. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem uma baixa atividade estrogênica de alguns filtros solares (Schlumpf *et al.*, 2004; Koda *et al.*, 2005).

Dentre os filtros solares disponíveis no mercado, a benzofenona-3 tem sido a responsável pela maior incidência de fotodermatites (Nash, 2006). Numerosos estudos vêm avaliando a absorção, distribuição, metabolismo e excreção da benzofenona-3 em ratos e em humanos após a sua aplicação tópica; tais estudos mostraram que esse filtro solar tem uma penetração cutânea estimada em 10% da dose aplicada, possui absorção sistêmica e até mesmo excreção nas fezes e urina (Okereke, Abdel-Rhaman e Friedman, 1994; Hayden, Roberts e Benson, 1997; Gustavsson Gonzalez, Farbrot e Larko, 2002; Janjua *et al.*, 2004;

Nash, 2006; Gonzalez, 2010). Em relação à excreção na urina, tem sido relatado que 0,5 a 9% da dose aplicada de benzofenona-3 tem sido encontrada na urina (Hayden, Roberts e Benson, 1997; Gustavsson Gonzalez, Farbroth e Larko, 2002; Gonzalez, 2010).

A benzofenona-3 é uma molécula altamente lipofílica e é metabolizada em diidroxibenzofenona que, por sua vez é excretada principalmente na urina. Acredita-se que absorção sistêmica da benzofenona-3 não tenha tanta relevância toxicológica, entretanto, a glucuronidação hepática para diversos fármacos em crianças menores de 2 anos não é tão alta como nos adultos, dessa forma, torna-se prudente não utilizar esse filtro solar em crianças menores que 2 anos, devido a esse risco de acúmulo no organismo (Strassburg *et al.*, 2002; Gonzalez, 2010). Apesar da benzofenona-3 não ser considerada tóxica, a sua absorção sistêmica merece atenção para alguns alvos toxicológicos sistêmicos (Benson, 2000), tais como toxicidade na reprodução de desenvolvimento e toxicidade cumulativa.

Outros estudos relataram que as benzofenonas apresentam um leve efeito anti-androgênico *in vitro*, entretanto estudos *in vivo* praticamente não mostraram efeitos adversos em roedores e em humanos (Jiang *et al.*, 1999; Nash, 2006). O Comitê Científico Europeu (*Scientific Committee on Consumer Products - SCCP*) concluiu que os filtros solares não apresentam efeito estrogênico que influenciariam a saúde humana (2001) e que a benzofenona-3, se utilizada até a 3%, apesar de seu alto potencial alérgico e fotoalérgico, não representa risco para a saúde do consumidor (2008). No entanto, a possibilidade de algumas substâncias apresentarem efeitos endócrinos ainda gera muitas discussões (Gonzalez, 2010).

Em resumo, a benzofenona-3 pode provocar uma leve irritação quando aplicada topicamente. Ela também possui absorção cutânea e sistêmica, até mesmo com sua detecção no sangue e urina, porém apresenta rápida metabolização. Além disso, vem sendo observada uma redução do seu uso na Europa, uma vez que é o fotossensibilizante mais comum em dermatites de contato e em fotodermatites, entretanto nos EUA e na Austrália, ela ainda é considerada bastante popular, devido à sua fotoestabilidade e ampla proteção (Gonzalez, 2010).

Os filtros solares exercem seus efeitos na superfície da pele, por isso é desejável que fiquem retidos no estrato córneo, a camada mais externa da pele, para que atinjam a maior proteção contra os raios UV com o menor grau possível de penetração transdérmica.

Nos últimos anos, novos filtros solares têm sido disponibilizados no mercado visando à redução de sua penetração cutânea, pois, conforme apresentado anteriormente, alguns filtros solares podem provocar reações de irritação e de fotoirritação, uma vez que a radiação UVA produz EROs por meio da interação agentes fotossensibilizantes exógenos, como é o caso de alguns filtros solares (Nash, 2006; Fourtanier, Moyal e Seite, 2008; Gonzalez, 2010; Shaath,

2010). Tais moléculas possuem alto peso molecular (maior que 500 Dalton) e possuem múltiplos cromóforos que levam a um alto coeficiente de extinção e um amplo espectro de proteção, dentre elas, podemos citar Etilxiltriazona, Polisilicone-15, Ecamsule, Bisdisulizol Dissódico, Drometrizol Trisiloxano, Bisotrizol e Bemotrizinol (Shaath, 2010).

Por outro lado, varias substâncias tem sido associadas a filtros solares em formulações anti-envelhecimento e fotoprotetoras sendo que a vitamina E tem sido descrita como o principal antioxidante da epiderme humana, e um marcador sensível para o dano oxidativo relacionado à exposição solar (Thiele e Ekanayake-Mudiyanselage, 2007). O éster da vitamina E (acetato de alfa-tocoferila), forma mais estável da vitamina E, tem sido bastante utilizado em formulações cosméticas devido as suas propriedades anti-radicaais livres, hidratantes e fotoprotetoras (Gehring, Fluhr e Gloor, 1998; Mcvean e Liebler, 1999; Gaspar e Campos, 2007). Essa substância absorve radiação UV na faixa de 300 a 350nm (Fryer, 1993; Antille *et al.*, 2003) Outros autores mostram que a vitamina E, quando em associação com a avobenzona, aumenta a fotoestabilidade desse filtro solar, sendo usando como um antioxidante e emoliente nas formulações estudadas (Meyer e Beasley, 2009). Entretanto, até o momento, não há relato de nenhum estudo realizado onde tenha sido proposta uma modificação estrutural dos filtros solares utilizando a vitamina E.

Assim, a presente pesquisa teve como metas desenvolver novos compostos análogos ao filtro solar benzofenona-3, visando, principalmente, aumentar o tamanho da molécula e ampliar sua absorção na faixa do UVA, bem como avaliá-los quanto a atividade antioxidante, fotoestabilidade e segurança.

Para o desenvolvimento de um novo filtro solar de alta performance, é necessário que este tenha um amplo espectro de absorção da radiação UVA e UVB, que seja estável, fotoestável e principalmente, seguro. Dentre os testes de segurança necessários para cosméticos de uso tópico podemos citar irritação, sensibilização, toxicidade e carcinogenicidade. De acordo com a região e horário de aplicação da formulação cosmética, deve ser considerada, ainda, uma potencial interação com a radiação UV e a produção de irritação, sensibilização, toxicidade ou carcinogenicidade fotoinduzidas (Hayden, Roberts e Benson, 1997).

Finalizando, apesar de algumas preocupações relacionadas aos riscos proporcionados pelo uso de alguns filtros solares, tais como a fotodegradação, atividade hormonal, absorção sistêmica, há várias evidências que mostram que seu uso é seguro. Estudos indicam que os benefícios proporcionados pelo uso de fotoprotetores superam os riscos ressaltados em alguns estudos (Nash, Tanner e Matts, 2006; Gonzalez, 2010). Entretanto, propostas de novos filtros

solares que não apresentem esses efeitos, tais como a apresentada no presente projeto, devem ser encorajadas para que seja possível a utilização de filtros solares cada vez mais eficazes e que, ao invés de apresentarem baixo risco e alguns relatos de fotodermatites, que não apresentem nenhum risco à população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele e a radiação solar

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área de superfície de aproximadamente $1,8 \text{ m}^2$ no indivíduo adulto, o que corresponde cerca de 16% do peso corporal. Constitui uma barreira eficiente contra agressores exógenos e impede a perda de água e de proteínas para o exterior. Além disso, age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico, da regulação da temperatura corpórea, da síntese de vitamina D3, excreção de eletrólitos e outras substâncias. Ao mesmo tempo fornece proteção contra microrganismos, radiação UV e agentes tóxicos (Infantozzi Costa, 2014).

Figura 1. Representação das camadas da pele.

Fonte: Adaptado de Medical Centre, Scott & Curzon Street, Toowoomba, 2014. Disponível em: http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas_da_pele.jpg . Acesso em 25 jul. 2014

É constituída por três camadas estruturais: a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme está estruturada por um grupo de células vivas denominadas, em conjunto, epiderme viável, a qual é composta por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. O estrato córneo, que também faz parte da epiderme, é composto por corneócitos e representa a principal barreira para a entrada de fármacos na pele (Menaar e Menaar, 2014).

A derme é a camada situada logo abaixo da epiderme, formada por denso estroma fibroelástico de tecido conectivo, que atua como suporte para extensas redes vasculares, nervosas, e anexos cutâneos que derivam da epiderme (Singh e Kumar, 2014) o que permite ter sensibilidade à temperatura, à pressão, à dor e ao tacto. A camada mais profunda da derme designa-se por hipoderme ou tecido celular subcutâneo, é uma camada de tecido conjuntivo frouxo localizado logo abaixo da derme, que tem como função unir a pele aos órgãos adjacentes (Avanaki e Hojjatoleslami, 2013).

A luz solar contém 20 vezes mais radiação UVA que UVB. Embora a radiação UVB seja quase totalmente absorvida na epiderme, é a maior responsável por danos como o efeito eritematogênico, queimadura solar, bronzeamento e fotocarcinogênese. A radiação UVA é dividida em UVA I ou UVA longo (340nm e 400nm) e o UVA II ou UVA curto (320nm e 340nm). É capaz de atingir a derme (Paris *et al.*, 2009; Osipov *et al.*, 2014), e pode danificar o DNA mitocondrial pela formação de oxigênio singlete, o que reduz a capacidade de controle da fosforilação oxidativa, gerando uma maior produção de EROs (Welss, Basketter e Schröder, 2004)

Assim, a exposição prolongada à radiação solar causa uma deterioração gradual das estruturas e da função da pele, devido ao dano cumulativo ao DNA. Estes processos bioquímicos são os responsáveis pela geração de problemas como imunossupressão, fotoenvelhecimento, queimaduras solares e câncer de pele (Bowman *et al.*, 2013).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para o biênio 2014/2015 haverá 5.890 novos casos de câncer de pele melanoma/ano e 182.130 novos casos de não melanoma/ano, o que mantém o câncer de pele como um dos problemas de maior incidência na população brasileira (INCA, 2014)

2.2 Fotoprotetores

Desde a Antiguidade até o início do século passado, o padrão de beleza consistia em ter aparência pálida ou ter pele clara, sendo que para esta finalidade se utilizavam chapéus, luvas e sombrinhas. Após a Primeira Guerra Mundial, houve uma inversão de valores. A palidez passou a ser associada às pessoas que não tinham tempo para o lazer ao ar livre, e aquelas de maior renda tinham tempo livre para aproveitar o sol do campo ou da praia, levando as pessoas a se exporem ao sol exageradamente e sem proteção. No entanto, o aumento do conhecimento sobre os efeitos deletérios do sol (envelhecimento precoce, predisposição ao câncer de pele e fotodermatoses) aumentou a necessidade de utilizar medidas de fotoproteção (Urbach, 2001; Shaath, 2010).

Denomina-se fotoproteção ao conjunto de estratégias físicas, químicas, comportamentais e ambientais, responsáveis por minimizar os efeitos nocivos decorrentes da exposição à radiação solar (Castro, 2007). Dentre as estratégias físicas, a Academia Americana de Dermatologia recomenda entre outros o uso de vestimentas apropriadas e óculos escuros para exposição prolongada ao sol (Castro, 2007; Balogh *et al.*, 2011).

Como estratégias químicas encontram-se os filtros solares utilizados em formulações fotoprotetoras, pois constituem a principal abordagem contra os efeitos nocivos da radiação UV,

por meio da absorção, dispersão ou reflexão da radiação. São geralmente classificados como filtros físicos (ou inorgânicos) e químicos (ou orgânicos) (Shaath, 2010; Kockler *et al.*, 2012).

Inicialmente, os filtros solares foram desenvolvidos para prevenção de queimaduras decorrentes da exposição ao sol. Sua utilização se intensificou nas duas últimas décadas, quando os efeitos nocivos do sol tornaram-se mais conhecidos e divulgados. Como consequência, houve um aumento da conscientização da população em geral sobre a necessidade da utilização de fotoprotetores (Salvador e Chisvert, 2005).

O dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) são os únicos compostos inorgânicos utilizados como filtros solares. Estes compostos são conhecidos como filtros físicos, pois bloqueiam a radiação na região UVB (290-320 nm) e UVA (320- 400 nm) por mecanismos de reflexão e dispersão (Serpone, Dondi e Albini, 2007). Esses filtros solares representam a forma mais segura e eficaz para proteger a pele, pois apresentam baixo potencial de irritação. As principais desvantagens destes filtros são a necessidade do uso de altas concentrações para atingir um alto valor de FPS, além de não serem bem aceitos pelos consumidores por deixarem a pele com aparência esbranquiçada após a aplicação da formulação (Jansen *et al.*, 2013; Lewicka *et al.*, 2013).

Os filtros solares orgânicos são classificados de acordo com a região que absorvem no espectro UV. Assim, as benzofenonas e os dibenzoilmetanos, classificados como absorvedores de UVA, são considerados filtros solares de amplo espectro, por absorverem na região de 300 a 360 nm. Já os aminobenzoatos, salicilatos, derivados de cânfora e cinamatos são os filtros UVB mais utilizados (Kockler *et al.*, 2012).

Os aminobenzoatos são derivados do ácido para-amino benzoico (PABA), e apresentam absorção na faixa entre 270 – 310 nm. Foram uma das primeiras moléculas em serem usadas como filtros solares. Apresentam um anel aromático dissubstituído em posição “para” por um grupo doador de elétron amino (NR_2) e um grupo aceptor de elétrons ácido carboxílico (COOR), que permitem a deslocalização da nuvem de elétrons na molécula e a excitação dela para um estado superior de energia (Shaath, 2010) (Figura 3)

Esquema 1. Deslocalização eletrônica do ácido para-amino benzoico. Adaptado de Shaath, 2010

Diversos estudos demonstram o potencial fotoalergênico destes filtros, assim como a sua capacidade de induzir eczema de contato e sensibilização cruzada. Por esse motivo, o uso do PABA como filtro solar foi interrompido no mercado (Shaath, 2010).

Os salicilatos absorvem na zona de 300 nm e são caracterizados pela presença de um anel aromático dissustituído na posição “*orto difuncionalizados*”, o que permite ter ligação hidrogênio intramoleculares e diminuir a quantidade de energia absorvida por esta (Salvador e Chisvert, 2005; Nash, 2006; Shaath, 2010)

Esquema 2. Deslocalização eletrônica dos salicilatos, Shaath, 2010

São compostos muito estáveis, não interagem com os solventes e são bem tolerados. Apresentam melhor ação quando associados a outros filtros solares. Os salicilatos foram os primeiros filtros UV usados em protetores solares. Os principais representantes dessa classe são salicilato de etil-hexila e homosalato, os quais, apesar deles serem fracos absorvedores UV, são considerados fotoestáveis (Shaath, 2010)

Os cinamatos são moléculas que apresentam um anel aromático dissustituído com um grupo doador de elétrons (OCH_3) e um grupo aceptor de elétrons (éster conjugado com dupla ligação), o que permite uma maior deslocalização de elétrons e uma absorção na faixa de 310 nm (Shaath, 2010; Kockler *et al.*, 2012).

Figura 2. Fórmula estrutural do metoxicinamato de etilexila

O trans-metoxicinamato de etilexila (Figura 2) é utilizado na maior parte dos fotoprotetores (75%), e possui um grupo metoxi na posição “*para à cadeia alifática*” que

facilita a deslocalização dos elétrons e é responsável por sua alta absortividade molar ($>23\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ a 305 nm) (Kockler *et al.*, 2012)

Esquema 3. Delocalização eletrônica dos cinamatos. Shaath, 2010.

Estas moléculas estão submetidas ao fenômeno de fotoisomerização entre os isômeros cis (Z) e trans (E). O isômero E é o predominante e é o que tem o $\lambda_{\text{máx}}$ de 310nm com o coeficiente de absortividade molar de $19\,500\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. O isômero Z tem $\lambda_{\text{máx}}$ de 312nm e o coeficiente de absortividade molar de $10\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Sob a influência da luz do sol, há uma predominância do isômero Z, com consequente redução da eficácia do filtro solar (Shaath, 2010).

Os derivados de cânfora protegem contra a radiação UVB na região de 290-300nm. Assim como os cinamatos, esses derivados sofrem fotoisomerização atingindo o equilíbrio fotoestacionário logo após a exposição à luz, e, ainda, apresentam boa fotoestabilidade (Deflandre e Lang, 1988). Como principal representante pode-se citar a metilbenzilideno cânfora (Figura 3).

Figura 3. Fórmula estrutural da metilbenzilideno cânfora

As benzofenonas são cetonas aromáticas com a capacidade de absorver a radiação UVB e grande parte da UVA. A principal característica é a presença do grupo doador de elétrons na posição “orto” ou “para” ao grupamento carbonila, o que resulta em duas $\lambda_{\text{máx}}$ em 286 nm (UVB) e 324 (UVA) (Shaath, 2010).

Esquema 4. Tautomerismo da benzofenona-3 (Shaath, 2010).

Apresentam excelente estabilidade fotoquímica. Entretanto, são responsáveis por inúmeras reações alérgicas ou dermatite de contato.

O principal representante dessa classe é a **benzofenona-3** (BZF3) (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), também conhecida como oxibenzona, metanona e difenilcetona. Um derivado benzofenônico utilizado em aplicações tópicas como filtro solar químico, absorve luz UVB (290 a 320 nm) e também parte da luz UVA (320 a 400 nm) (De Laurentiis *et al.*, 2013).

Figura 4. Estrutura da benzofenona-3

Estudos têm demonstrado a sua penetração através da barreira epidérmica após a aplicação por fricção na superfície do corpo. Foi detectada na urina até cinco dias depois da última aplicação (Gustavsson Gonzalez, Farbrot e Larko, 2002).

Gupta e colaboradores (1999) avaliaram a absorção percutânea da BZ3 e do metoxicinamato de octila (MCO) e observaram uma maior penetração de BZ3 nas camadas mais profundas da pele, quando comparada ao MCO. O oposto ocorreu no estrato córneo, ou seja, observou-se maior teor de MCO retido na camada mais superficial da pele quando comparado à BZ3. A maior retenção no estrato córneo do MCO se deve, provavelmente, ao seu superior coeficiente de partição octanol/água (LogP) 5,65, quando comparado ao LogP da BZ3, 2,63 demonstrando a maior lipofilicidade do MCO e indicando que o estrato córneo estaria exercendo uma barreira para a permeação do MCO (Gupta, Zatz e Rerek, 1999).

Os dibenzoilmetanos são dicetonas substituídas. Apresentam tautomerismo ceto-enólico, sendo que o $\lambda_{\text{máx}}$ do enol encontra-se na região UVA (350nm) e o ceto na região do UVC (<290 nm), o que os tornam, na forma enol, em agentes adequados para proteção UVA (Shaath, 2010; Kockler *et al.*, 2012).

Esquema 5. Tautomerismo da avobenzona

Estes compostos apresentam coeficientes de extinção molares excepcionalmente elevados (>30.000); entretanto apresentam dificuldade de solubilização e fotoinstabilidade, o que as levam a gerar produtos de degradação tais como tert-butil ácido benzóico, tert-butil benzeno e ácido p-metoxi benzóico (Schwack e Rudolph, 1995; Kockler *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, várias moléculas de alto peso molecular (maior de 500 Dalton). vêm sendo desenvolvidas na Europa, com o objetivo de dificultar a penetração cutânea e consequentes reações indesejáveis na pele. Estas moléculas possuem cromóforos com alto coeficiente de absorção molar além de amplo espectro (Shaath, 2010). Como exemplos destas moléculas estão:

- Etilhexil triazona (UVB, PM 823);
- Polisiloxano de benzilideno malonato (polysilicone-15) (UVB, PM ~6000);
- Ácido Tereftalilideno dicânfora sulfônico (UVA, PM 607);
- Fenil dibenzimidazol disódico (UVA, PM 675);
- Trisiloxano Drometrizol (UVA/UVB, PM 501);
- Metileno bis-benzotriazoliltetrametilbutil fenol (UVA/UVB, PM 659);
- Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (UVA/UVB, PM 629)

2.3 Avaliação da performance de fotoprotetores

Para o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras, é necessária a realização de testes com o intuito de avaliar diversas características relacionadas à sua segurança e eficácia, incluindo estabilidade, fotoestabilidade, irritação, sensibilização, penetração cutânea, determinação, em humanos, do fator de proteção solar (FPS) do fator de proteção UVA (FP-UVA), bem como determinação da resistência à água e da amplitude da proteção UV (ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012).

2.3.1 Fotoestabilidade

A fotoestabilidade é uma propriedade das moléculas que, quando utilizada como parâmetro farmacêutico, descreve como um fármaco responde à exposição à luz (solar ou

artificial) e envolve não somente as reações de fotodegradação, mas também outros processos, como formação de radicais livres, transferência de energia e reações de rearranjo molecular de cada substância. (Tønnesen, 2014).

A fotoestabilidade dos filtros UV está estritamente ligada à sua capacidade de liberar a energia absorvida para o ambiente sem sofrer alterações estruturais, por tanto define a capacidade fotoprotetora após a absorção da radiação UV. Os filtros químicos apresentam maior instabilidade quando comparados aos filtros físicos em virtude de seu mecanismo de ação onde a geração de radicais livres é a principal característica de fotoinstabilidade (Deflandre e Lang, 1988).

Assim, os estudos de fotoestabilidade permitem avaliar a estabilidade intrínseca da molécula de um fármaco (ou do produto final) frente à exposição à luz, indicando se tal exposição representa riscos de alteração ou mudanças inaceitáveis. Também permite determinar padrões de degradação e validação do método analítico, estabelecendo o quão adequados são os procedimentos de análise propostos para o fármaco em questão (Kockler *et al.*, 2012).

A diminuição da capacidade absorptiva em decorrência da instabilidade dos filtros UV químicos resulta no aumento da quantidade de radiação que incide direto sobre a pele e, conseqüentemente, aumenta o poder deletério dos raios solares sobre o organismo humano (Gaspar e Maia Campos, 2006; Serpone, Dondi e Albini, 2007).

2.3.2 Avaliação da eficácia de fotoprotetores

A eficácia dos filtros solares depende de sua incorporação em veículos apropriados. As propriedades hidrofílicas e lipofílicas, pH, estabilidade em temperaturas elevadas e propriedades emolientes do veículo, influenciam o fator de proteção solar (FPS). (Gaspar e Maia Campos, 2006; Serpone, Dondi e Albini, 2007).

Para um filtro solar ser eficaz na pele humana, ele deve: absorver a radiação UV dissipando a energia absorvida com o mínimo impacto para os tecidos (epiderme e derme), impedindo a formação de EROs; possuir um alto coeficiente de extinção molar (ϵ) na faixa de absorção do UV e ser fotoestável (Gaspar e Maia Campos, 2006).

Diversos filtros solares podem ser degradados pela radiação UV gerando subprodutos que ao entrarem em contato direto com a pele podem promover fototoxicidade ou dermatite de contato. A interação de produtos de fotodegradação com os demais excipientes ou com componentes da pele pode levar à formação de compostos com propriedades toxicológicas desconhecidas (Kockler *et al.*, 2012). Os filtros solares devem, então, ser resistentes à água,

não devem penetrar na pele e permanecer aderidos na superfície cutânea, ou seja, no EC, formando um filme protetor (Gaspar e Maia Campos, 2006).

Em junho de 2012, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos (ANVISA, 2012), que definiu alguns parâmetros a serem adotados para novos protetores solares, entre eles: apresentar FPS mínimo de 6; apresentar Fator de Proteção UVA cujo valor corresponda a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem e o termo “bloqueador solar” não é mais permitido.

Dentre outros métodos utilizados para a triagem de formulações estão a determinação da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico (Diffey, 1994) os quais são medidas relativas do espectro de absorção do fotoprotetor. Em relação ao comprimento de onda crítico, os fotoprotetores são agrupados em cinco categorias, visto que a categoria de maior proteção UVA é atingida com o comprimento de onda crítico superior a 370 nm (DIFFEY, 1994, Anvisa 2012). A razão UVA/UVB é amplamente utilizada para a medida da fotoestabilidade, já que se trata de um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo (Bonda e Pavlovic, 2009).

2.3.3 Avaliação da fototoxicidade

Alguns fármacos se mostram fotoquimicamente inertes, uma vez que não se decompõem durante exposição à luz. No entanto, podem atuar como potenciais fontes de formação de radicais livres e de metabólitos fototóxicos e fotorreativos *in vivo*. Essa fotorreatividade pode ser observada após administração do fármaco ou após a exposição do paciente a fontes de luz natural ou artificial, induzindo efeitos adversos, os quais são considerados reações fototóxicas ou fototoxicidade (Serpone, Dondi e Albini, 2007; Tønnesen, 2014).

Por outro lado, o maior efeito adverso reportado é a fotossensibilização, principalmente de reações cutâneas, que são consideradas reações fototóxicas. Os sintomas ou as manifestações clínicas são eritemas (por vezes exagerados), eczemas, edemas sob a forma de erupções na forma de vesículas sobre a pele exposta, hiperpigmentação, descamação e inchaço. Estas reações aparecem imediatamente após a primeira exposição ao sol e podem ocorrer em extensas áreas da pele. Este fenômeno está associado com a imediata resposta das células imunológicas (Alsante *et al.*, 2007; Tønnesen, 2014).

Os efeitos fototóxicos apresentam mecanismos de reação bastante complexos e são dependentes da exposição do indivíduo às fontes de luz (artificial ou solar) após administração do fármaco. Do mesmo modo, o fármaco ou seus produtos de fotodegradação

transportados até os tecidos próximos da superfície do organismo, como olhos (retina), pele e cabelo, podem desencadear efeitos tóxicos após exposição à luz (Serpone, Dondi e Albini, 2007; Tønnesen, 2014).

Durante muitos anos, os testes em animais foram à única ferramenta capaz de avaliar a segurança de matérias-primas e produtos cosméticos acabados antes do uso humano. Entretanto, muitos esforços foram feitos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais que fossem meios seguros para a avaliação da segurança de cosméticos. (Liebsch *et al.*, 2005).

Assim, desde o ano 2000, na Europa, os testes em animais, para a avaliação do potencial fototóxico agudo não são mais permitidos, uma vez que se chegou no consenso que o potencial fototóxico agudo pode ser bem avaliado por métodos *in vitro*, alternativos ao uso de animais. O teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3 (3T3 NRUP: 3T3 - *Neutral Red Uptake – Phototoxicity Test*) é considerado o principal teste para esta avaliação, uma vez que apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de ser um teste validado e reconhecido pela OECD . (Liebsch *et al.*, 2005); ECVAM, 2014). O 3T3 NRU PT foi validado com sucesso entre 1992 e 1998 (ECVAM, 2014) foi aceito para fins regulatórios por parte da União Europeia no ano de 2000, pela OCDE em 2002, e pela FDA dos EUA em 2003 (Liebsch *et al.*, 2005).

Nesse teste, células 3T3 de Balb/c cultivadas em duas microplacas de 96 poços, são pré-incubadas com oito concentrações diferentes da substância química a ser analisada. Uma placa é então exposta à radiação UVA e a outra é mantida ao abrigo da luz, para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência de radiação para a posterior determinação da cito e fototoxicidade da substância (Liebsch *et al.*, 2005).

2.3.4 Avaliação da atividade antioxidante

O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Ocorre quando a produção de radicais livres está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção encontram-se deteriorados.

As EROs estão presentes no organismo humano atacando e causando prejuízos a diversas moléculas importantes presentes no mesmo, inclusive a complexa molécula de DNA pode ser atingida. Os radicais livres reagem em frações de segundos e podem provocar reações em cadeia agindo destrutivamente sobre um tecido (CHEN, HU e WANG, 2012).

A estratégia para a proteção das células contra os danos causados pelos radicais livres é denominada como citoproteção, está baseada na procura de um agente de proteção ideal que

possua seletividade e amplo espectro (proteção de numerosos tecidos contra uma ampla variedade de agentes citotóxicos). Estes agentes de proteção são denominados antioxidantes.

Antioxidante é definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, inibe a oxidação do substrato oxidável de maneira eficaz. Ao reagir com os radicais livres os antioxidantes cedem um elétron, sofrendo oxidação e se convertendo num radical livre mais fraco, com poucos ou nenhum efeito tóxico (Stahl e Sies, 2001).

Os antioxidantes têm diferentes mecanismos de ação, alguns são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, e as bases do DNA, evitando assim, a formação de lesões e perda da integridade celular. Exemplo deles são os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenoides (Criado e Moya, 2009; Tzanova *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais livres. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (Bianchi *et al.*, 1999).

2.4 Técnicas de análise

Os métodos instrumentais de identificação estão fundamentados nas propriedades moleculares e nas propriedades espectroscópicas das moléculas orgânicas como a espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV-VIS), espectroscopia na Região do Infravermelho (IV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Estes métodos quando acoplados a espectrometria de massas são excelentes ferramentas na identificação dos compostos orgânicos. A seguir são apresentados os conceitos básicos e introdutórios dos métodos utilizados durante o desenvolvimento do projeto.

2.4.1 Espectroscopia de RMN

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica de análise de substâncias baseada na propriedade de uma amostra absorver radiação eletromagnética a uma determinada frequência, definida pela natureza dos núcleos presentes e pelas características estruturais da molécula (Silverstein, Webster e Kiemle, 2000)

Os núcleos atômicos estão sujeitos a ambientes químicos e magnéticos diferentes absorvendo energia em uma frequência específica o que permite a sua identificação e diferenciação dentro de uma mesma molécula. Da mesma forma, a movimentação molecular e as interações com ambientes magnéticos distintos fazem com o tempo de relaxação entre os

núcleos seja diferente. A análise destas características próprias para cada núcleo atômico na molécula fornece informações sobre a composição química e as propriedades físico-químicas da amostra (Paiva, Lampman e Kriz, 2010).

A importância do RMN para a elucidação de moléculas em química está baseada no fato de esta técnica permitir diferenciar os núcleos dos átomos no seu ambiente imediato. A combinação de dados de massas e RMN é muitas vezes suficiente para determinar completamente a estrutura de uma molécula desconhecida (Ribeiro e Souza, 2014).

2.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas se constitui numa importante ferramenta de análise orgânica cujo propósito central é converter uma substância em sub-produtos (fragmentos moleculares) mensuráveis que são indicativos da estrutura da molécula original. A reação é iniciada com a ionização da amostra através da remoção de um elétron da camada de valência, formando uma espécie altamente energética que se degrada tal que os produtos formados são cátions, ânions, radicais e pequenas moléculas neutras (Silverstein, Webster e Kiemle, 2000).

Todos os fragmentos carregados positivamente passam através de uma série de fendas constituídas por placas carregadas negativamente onde são acelerados e enviados para dentro do analisador de íons, onde então serão separados pela razão massa/carga (m/z).

Os métodos de ionização mais conhecidos são: ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por electrospray (ESI). Os métodos de EI e CI são adequados para analisar apenas moléculas voláteis e termicamente estáveis, pois os íons são formados após a molécula ser volatilizada. A técnica FAB pode ser aplicada para amostras polares, iônicas, termicamente lábeis, energeticamente instáveis e de alto peso molecular, que normalmente não podem ser analisadas pelas técnicas EI e CI. A técnica MALDI baseia-se na ionização do analito adsorvido em uma substância (matriz) por um feixe de laser. Na técnica APCI as moléculas do solvente são transferidas à fase gasosa, sendo então, aplicado uma tensão em uma agulha, próximo à saída do vaporizador, que cria uma descarga de íons através de interações com as moléculas do gás de arraste e do solvente (Holler, Nieman e Skoog, 2009)).

O objetivo dessa pesquisa foi desenvolver novos análogos ao filtro solar benzofenona-3 e determinar o seu potencial fotoprotetor por meio da avaliação da absorção UV e avaliação da fotoestabilidade, fototoxicidade e atividade antioxidante.

Para tal foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- Síntese dos análogos ao filtro solar benzofenona-3, utilizando diferentes estratégias sintéticas que envolvem reações aminação de Buchwald Hartwig, esterificação e heterociclicização catalisada por paládio.
- Avaliação do espectro de absorção no UV das moléculas sintetizadas
- Avaliação da fotoestabilidade das moléculas sintetizadas
- Avaliação da fototoxicidade das moléculas sintetizadas
- Avaliação da atividade antioxidante das moléculas sintetizadas

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados nos processos de extração e síntese, foram adquiridos através da empresa Synth, e purificados, conforme métodos usuais descritos na literatura (PERRIN e ARMAREGO, 2014). Os solventes utilizados na extração e síntese foram adequadamente separados e enviados para o centro de tratamento de resíduos.

A seguir é apresentada a lista dos solventes utilizados durante o desenvolvimento do projeto:

- Hexano
- Acetato de etila
- Diclorometano
- Tolueno
- Tetrahidrofurano

Os reagentes utilizados nos processos de síntese são apresentados a seguir:

- Ácido Clorídrico, P.A., Synth
- Hidróxido de Sódio P.A., Synth
- Carbonato de cézio, P.A., Synth
- t-butóxido de sódio, P.A., Synth
- Anidro Tríflico, P.A. Sigma-Aldrich
- 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthalene (BINAP) P.A. Sigma-Aldrich
- Benzofenona imina, P.A. Sigma-Aldrich
- Acetato de paládio, P.A. Sigma-Aldrich
- 2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (XPhos), P.A. Sigma-Aldrich
- Alfa Tocoferol, (nomenclatura INCI: 3,4-DIHYDRO-2,5,7,8-TETRAMETHYL-2-(4,8,12-TRIMETHYLTRIDECYL) 2HBENZOPYRAN-6-OL), DSM
- Benzofenona-3 (nomenclatura INCI: 2-HIDROXI-4-METOXI BENZOPHENONE; IUPAC: 2-HYDROXY-4-METHOXYPHENYL)-PHENYLMETHANONE, Symrise
- Avobenzona (nomenclatura INCI: BUTYL METHOXYDIBENZOILMETHANE; IUPAC: 1-(4-tert-butylphenyl)-3-(-4-methoxyphenyl)-propane-1,3-dione), DSM

4.1.2 Equipamentos e acessórios

Abaixo é apresentada a descrição dos equipamentos utilizados durante procedimentos sintéticos.

- Agitador magnético: IKAC-MAG H57
- Balança analítica Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Bomba de alto vácuo E2M5 (Edwards)
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-210
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Ponto de fusão Marconi MA 381
- Tubos de RMN 17.5 cm, 5 mm de diâmetro (Sigma Aldrich)
- Coluna de Cromatografia clássica. Sílica gel clássica com porosidade 63-200 μm , sílica gel Flash com porosidade 40-63 μm .
- RMN : espectrômetro BRUKER® - Modelo DRX500 - Ultra Shield®, com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (^1H : 500,13 MHz e ^{13}C : 125,77 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de “lock” de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹). Espectrômetro BRUKER® - Modelo DRX400 - Ultra Shield®, com magneto de 9,4T e sonda multinuclear de detecção inversa (^1H : 400 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de “lock” de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹).
- Mass Spectrometer ultrOTOFG - ESI-TOF, de Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, sob essas condições: Bomba de Infusão, Fluxo 300 $\mu\text{l/h}$. O modo de detecção foi positivo e negativo para as amostras. Também os espectros foram obtidos através de GCMS, modelo QP-2010, Shimatsu, coluna DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25 μm).
- Espectrofotômetro infravermelho Perkin-Elmer modelo 1600-FT,
- Espectrofotômetro ultravioleta Gehaka, modelo UV-380G, São Paulo, Brazil. Os dados foram obtidos no software UVSPECTRUM®

4.2 Métodos

A seguir serão apresentados os métodos utilizados para o desenvolvimento do projeto na ordem em que foram utilizados. Assim, o primeiro item faz referência aos métodos de síntese e é seguido pelos métodos de análise e determinação dos compostos sintetizados finalizando pelos métodos de avaliação das características fotoprotetoras e antioxidantes.

4.2.1 Métodos de síntese

Foram planejados e sintetizados análogos da benzofenona-3, utilizando diferentes estratégias sintéticas que envolvem reações aminação de Buchwald Hartwig, esterificação e heterociclização catalisada por paládio.

As estratégias e procedimentos de síntese orgânica foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Flavio da Silva Emery, no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal da FCFRP/USP.

A seguir são apresentados os análogos da benzofenona-3 e as estratégias sintéticas utilizadas para a obtenção.

4.2.1.1 Triflato de benzofenona-3 (B2)

Esquema 6. Síntese para obtenção da benzofenona-3 triflato, (**B2**).

Para a obtenção do triflato de benzofenona-3 (**B2**), a benzofenona-3 (2, mmol) foi dissolvida em 5 mL de diclorometano e 3 mL de piridina em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado lentamente o anidrido trifílico (2mmol) deixando a reação sob agitação por 2 horas. O produto da reação foi extraído com acetato de etila e lavado com solução saturada de sulfato de cobre e água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada por cromatografia em coluna com sílica gel Flash com porosidade 40-63 μm e adição de pressão por ar comprimido usando como eluente uma mistura de Hexano:acetato de etila em proporção 80:20

4.2.1.2 Carbonato de benzofenona-3 (B3)

Esquema 7. Síntese do carbonato de benzofenona-3, (B3)

Para obter o carbonato de benzofenona-3, a benzofenona-3 (1mmol) foi dissolvida em diclorometano (5mL) seguido da adição de trietilamina (1 mmol) e clorocarbonato de etila (2 mmol) deixando sob agitação em refluxo por 2 horas. A reação foi concentrada e purificada em coluna com sílica gel Flash com porosidade 40-63 μm e adição de pressão por ar comprimido usando como eluente uma mistura de Hexano:Acetato de etila em proporção 80:20

4.2.1.3 Benzofenona (B4)

Esquema 8. Retrossíntese da benzofenona (B4)

O esquema 3 apresenta a retrossíntese da benzofenona (**B4**). **B4** foi obtido de uma reação de eliminação do grupamento triflato em uma reação de aminação de Buchwald-Hartwig entre alfa-tocoferamina (**T4**) e a benzofenona-3 triflato (**B2**) que visava à obtenção do análogo de benzofenona-3 com alfa-tocoferol e que utilizava o grupo amino como espaçador. A síntese do composto **B2** está descrita no esquema 1. A seguir, está representada a obtenção da alfa-tocoferamina (**T4**) e a benzofenona (**B4**).

Finalmente, na síntese de **B4** foi realizada uma reação de aminação de Buchwald-Hartwig. Para tal, a α -tocoferamina (0,5 mmol), Triflato de benzofenona-3 (0,5 mmol),

acetato de paládio (10mol%); ligante (2',4',6'-Triisopropilbifenil-2-diciclohexilfosfino) XPhos, (15mol%) e carbonato de cério (0,59 mmol) foram dissolvidos em 5mL de tolueno seco. O sistema foi deixado sob agitação em refluxo em atmosfera de nitrogênio. Após 24 horas, o produto da reação foi extraído com acetato de etila e lavado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada por cromatografia em coluna sílica gel clássica com porosidade 63-200 μm , usando como eluente uma mistura de Hexano:acetato de etila em proporção 95:5.

4.2.1.4 Benzofenona-3 fenilamino (B5)

Para a síntese da benzofenona-3 fenilamino, a benzofenona-3 triflato (0,22 mmol), anilina (0,26 mmol), acetato de paládio (0,01 eq); ligante XPhos (0,3 eq) e carbonato de cério (1,2 eq) foram dissolvidos em 5mL de tolueno seco, e deixados sob agitação em refluxo sob atmosfera de nitrogênio a 85°C, conforme o esquema 6. Após 24 horas, os produtos da reação foram extraídos com acetato de etila e lavados com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada em coluna de sílica gel clássica com porosidade 63-200 μm , usando como eluente uma mistura de Hexano:acetato de etila em proporção 90:10.

Esquema 10. Síntese da benzofenona-3 fenilamino, (**B5**)

4.2.1.5 Carbazol da benzofenona-3 Fenilamino (B6)

Para a síntese do carbazol da benzofenona-3 fenilamino, **B5** (0,28 mmol), acetato de paládio (30 mmol%), acetato de cobre (2,5 eq) foram dissolvidos em 10 mL de ácido acético e deixados sob agitação em refluxo a 120°C. Após 48 horas, a mistura reacional foi neutralizada utilizando 50 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 , conforme o esquema 11. Os produtos da reação foram extraídos com acetato de etila e lavados com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada em coluna de sílica gel clássica com porosidade 63-200 μm , usando como eluente uma mistura de Hexano:acetato de etila em proporção 98: 2.

Após a síntese de **T5**, procedeu-se a obtenção do **B7**. Para isso, o alfa tocoferol succinato (0,50 mmol) foi dissolvido em diclorometano (10 mL). Em seguida, foi adicionado cloreto de tionila (1,5 eq), deixando-se em refluxo e sob agitação a temperatura de 60°C. Após 2 horas, o excesso de cloreto de tionila foi removido por pressão reduzida. O produto bruto foi redissolvido em diclorometano e posteriormente foi adicionada, gota a gota uma solução de benzofenona-3 (0,8 mmol) e a TEA (3,8 mmol), em diclorometano (20 mL). Por fim, o sistema foi mantido sob agitação em banho de gelo durante 1 hora. A fase orgânica foi concentrada e purificada em coluna de sílica gel clássica com porosidade 63-200 μm , utilizando como eluente uma mistura de Hexano:acetato de etila em proporção 50:50.

4.2.2 Caracterização das moléculas

Os produtos foram isolados por cromatografia em coluna e identificados utilizando espectroscopia RMN e espectrometria de massas.

4.2.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada (C.C.D.) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254-MERCK. Para a visualização dos componentes, foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254nm). É importante ressaltar que essa técnica foi utilizada para acompanhar a evolução da reação, avaliando o consumo das matérias de partida.

4.2.2.2 Espectroscopia de ^1H RMN

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) foram registrados utilizando os equipamentos e especificações descritos no item 4.1.2. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= simpleto, sl= simpleto largo, d=dupleto, t= tripleto, q= quadrupeto, quin= quintupeto, dd= duplo dupleto, ddd= duplo duplo dupleto, dt= duplo tripleto, m= multipeto), a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.

4.2.2.3 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução apresentado no item 4.1.2. Antes de realizar as análises o equipamento foi calibrado com solução de NA-TFA a 10mg/ml(TOF).

4.2.3 Avaliação da performance

4.2.3.1 Absorção no ultravioleta e avaliação da eficácia

A análise da absorção no UV, a determinação do comprimento de onda máximo (λ máx) e o cálculo do coeficiente de extinção molar (ϵ) foram obtidos pelo espectrofotômetro (item 4.1.2), na faixa de 200 - 400nm. A avaliação dos espectros no ultravioleta foi realizada em diferentes solventes (DMSO, isopropanol, metanol e hexano), em concentração de 1,5E-05 mmol/mL e a leitura feita em triplicata.

A avaliação da eficácia foi realizada utilizando os parâmetros de razão UVA/UVB e de comprimento de onda crítico, de acordo com a ANVISA (2012). .

A razão UVA/UVB é definida como à relação entre a integral do espectro de absorção na faixa UVA (320-400nm) e a integral do espectro de absorção na faixa UVB (290-320 nm) (Diffey, 1994; Balogh *et al.*, 2011), e permite a classificação do nível de proteção UVA em estrelas, sendo que o maior número destas corresponde a uma maior proteção UVA estimada. (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação de acordo com o Boot's Star System da proteção UVA oferecida pelo fotoprotetor com base na razão UVA/UVB.

Razão UVA/UVB	Estrelas	Descrição da Proteção UVA
0.0<0.2	-	Muito baixa
0.2<0.4	*	Moderada
0.4<0.6	**	Boa
0.6<0.8	***	Superior
0.8<0.9	****	Máxima
≥0.9	*****	Ultra

Fonte: Adaptado de Balogh et al. (2011)

A avaliação da **Razão UVA/UVB ou Boot's Star Rating** envolve a medida de absorção da formulação no intervalo de 290 a 400 nm, como apresentado no item 4.2.3.1. Após esse processo, é realizado o cálculo da razão das áreas sob a curva UVA em relação à UVB (Equação 1) (Balogh *et al.*, 2011).

$$\frac{UVA}{UVB} = \frac{\int_{320\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A\lambda.d\lambda}{\int_{290\text{ nm}}^{320\text{ nm}} A\lambda.d\lambda} \text{Equação 1}$$

O **comprimento de onda crítico (λ_c)** corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nm, sendo que o valor obtido deve ser no mínimo equivalente a 370 nm (Diffey, 1994; Balogh *et al.*, 2011).

A avaliação do comprimento de onda crítico foi realizada com base no espectro de absorbância das moléculas, conforme o item 4.2.3.1 e calculado pela equação 2.

$$R = \frac{\int_{320\text{ nm}}^{\lambda_{nm}} A\lambda.d\lambda}{\int_{290\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A\lambda.d\lambda} \text{Equação 2}$$

A relação entre os níveis de proteção UVA/UVB e o comprimento de onda crítico está informada na Tabela 2 (Diffey, 1994; Balogh *et al.*, 2011).

Tabela 2. Intervalo de comprimentos de onda críticos e sua relação com o nível de proteção e a razão UVA/UVB (Diffey, 1994; Balogh *et al.*, 2011).

(Diffey, 1994) λ_c	Nível de proteção UVA/UVB
$340\text{ nm} \leq \lambda < 370\text{ nm}$	Intermediária
$\geq 370\text{ nm}$	Maior (amplo espectro)

4.2.3.2 Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV

Para a realização desse estudo, foram preparadas soluções das substâncias (B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7) na faixa de concentração entre 3 μM e 2 mM. A seguir, 5 mL de cada solução foram adicionados em béqueres de vidro, submetidas à evaporação do solvente para a formação de um filme seco. As amostras foram submetidas a radiação UVA de 15,2 mW/cm^2 emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) por 115 minutos, o que forneceu uma dose de radiação UVA acumulativa de 13,68 J/cm^2 (Kockler *et al.*, 2012). A dose de radiação foi medida pelo radiômetro VLX-3W Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, France) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA (365 nm) e da radiação UVB (312 nm).

Cada béquer submetido à irradiação tinha um controle negativo, ou seja, um béquer deixado ao abrigo da luz (Gaspar e Maia Campos, 2006; Gaspar e Campos, 2007).

Após a irradiação, o filme seco foi ressuspensionado em 5 mL de solvente e as soluções foram analisadas em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400nm. Isto permitiu determinar o espectro de absorção e a área sob a curva (integral do espectro de absorção) das amostras na faixa do UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm), utilizando-se a função integração do Software Microcal Origin. A seguir, foi obtida a razão entre integral do espectro de absorção na faixa UVA e integral do espectro de absorção na faixa do UVB, conforme a equação 1 (Diffey, 1994; Gaspar e Maia Campos, 2006; Gaspar e Campos, 2007). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3.2.1 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos nos estudos de fotoestabilidade foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que a maioria das amostras apresentava distribuição não normal.

4.2.3.3 Avaliação da fototoxicidade

O potencial fototóxico das moléculas de benzofenona-3 (**B1**), Benzofenona-3 Triflato (**B2**), Carbonato de benzofenona-3 (**B3**), benzofenona-3 amino amino (**B5**), carbazol da benzofenona-3 fenil amino (**B6**) e o aduto de benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (**B7**), foi determinado por meio do teste em cultura de fibroblastos 3T3 NRU PT. Para tal, inicialmente as substâncias foram diluídas em DMSO e foram realizadas 8 diluições sucessivas em DPBS, com um fator de diluição constante (1.47), sendo que a concentração final de DMSO não excedeu 1%. Assim, as 8 concentrações estudadas para as substâncias isoladas foram de 6.8, 9.9, 14.6, 24.4, 31.5, 46.3, 68.0 e 100 µg/mL. Os estudos foram realizados em duplicata.

4.2.3.3.1 Linhagem celular de fibroblastos 3T3

Foi utilizada uma cultura de fibroblastos linhagem Balb 3T3, clone 31, ATCC (*American Type Culture Collection*), a qual foi utilizada no estudo de validação do método realizado pela Comunidade Européia (Liebsch *et al.*, 2005; Ecvam, 2014).

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

4.2.3.3.2 Fototoxicidade em cultura de fibroblastos

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo INVITTOX nº 78 (Liebsch *et al.*, 2005). Para tal, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo Balb/C 3T3 clone 31 ATCC, conforme apresentado no item 4.2.3.3.1 As características dos fibroblastos nas diversas etapas do estudo, a sua viabilidade frente à radiação UV e a captação do corante vermelho neutro foram monitorados por Microscópio biológico binocular invertido.

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

Após a avaliação da sensibilidade das células à radiação, foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada substância. Para tal, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura (1×10^5 células/mL) e, a seguir, foram inoculados 100µL dessa suspensão (1×10^4 células) em 60 poços centrais de cada microplaca. Os 36 poços laterais das microplacas foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para a determinação da citotoxicidade (na ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO₂, para a formação de uma monocamada semiconfluente. A seguir, as células foram decantadas, separadas do meio de cultura e cada poço foi lavado com DPBS (tampão fosfato modificado por Dubelcco contendo cálcio).

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100µL de 8 diferentes concentrações de cada substância em estudo diluídos em DMSO / DPBS: B1, B5 e B6 de acordo com o modelo apresentado na Figura 5. Cada experimento foi realizado em duplicata.

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

Figura 5. Delineamento da microplaca de 96 poços para o teste de fototoxicidade CNT = Controle não tratado (contendo células, porém sem nenhuma substância teste); b = branco, contendo DPBS (não contém células, porém tratada com meio vermelho neutro e solução de dessorção).

As 2 microplacas foram incubadas por 1h e, a seguir, uma delas foi submetida à radiação UVA de 6.3 mW/cm^2 por 13 minutos, emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 o que equivale a uma dose total de 5 J/cm^2 de radiação UVA, para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como um controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com DPBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas incubadas a 37°C por 20h. A seguir, $100\mu\text{L}$ de meio DMEM contendo uma solução de $50 \mu\text{g/mL}$ do corante vital vermelho neutro foi adicionada em cada poço e as células incubadas por 3 h a 37°C . Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por água /etanol / ácido acético foi acrescentada em cada poço.

Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi realizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm em leitor de microplacas Biotek Synergy 2, e os dados analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo ZEBET, Alemanha) para o cálculo do PIF (“photo irritation factor” - fator de fotoirritação) - e do MPE (“mean photo effect” – foto efeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico.

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

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)} \text{Equação 3}$$

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

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{ci}}{\sum_{i=1}^n w_i} \text{Equação 4}$$

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

4.2.3.3.3 Modelo de Predição

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

PIF < 2 ou MPE < 0.1 prediz: “nenhuma fototoxicidade”,

2 < PIF < 5 ou 0.1 < MPE < 0.15 prediz: “provavelmente fototóxico” e

PIF > 5 ou MPE > 0.15 prediz: “fototóxico”.

4.2.3.4 Avaliação da capacidade antioxidante (HRP-H₂O₂-luminol.)

A atividade antioxidante dabenzofenona-3 (B1), carbonato de benzofenona-3 (B3), benzofenona-3 fenil amino (B5), carbazol da benzofenona-3 fenil amino (B6), alfa-tocoferol (T1) e delta-tocoferol (P), foi avaliada pela ação da enzima horseradish peroxidase (HRP), na presença H₂O₂, a qual é capaz de oxidar o luminol, levando produção de quimioluminescência (Dure e Cormier, 1964) (Esquema 14).

Para a realização do ensaio as soluções de H₂O₂ e de HRP foram preparadas em tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 7,4), enquanto que as soluções das moléculas avaliadas (B1, B3, B5, B6, T1 e P) e de luminol foram preparadas em DMSO. O teste foi realizado em três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

A concentração inicial das soluções utilizadas foram: H₂O₂ (50 µmol/L), luminol (140 µmol/L) e das substâncias-testes B1, B3, B5, B6, T1 e P (20µM). Procedeu-se à adição de diferentes alíquotas da solução de HRP (0,2 UI/mL) a cada uma delas. Em seguida, a reação

foi homogeneizada e, imediatamente a seguir, foi realizada a leitura da QLHRP por 15 minutos a 30°C em luminômetro.

Esquema 14. Esquema simplificado da produção de quimioluminescência pela reação HRP- H_2O_2 -luminol. (1): O H_2O_2 é convertido em água pela HRP (horseradish peroxidase), gerando o intermediário composto I. (2): O composto I oxida o luminol, produzindo o composto II. (3): Oxidação do luminol pelo composto II, regenerando o sítio catalítico da enzima. (4): As reações 2 e 3 produzem luminol na forma de radical livre, que gera o ânion aminofthalato no estado eletronicamente excitado. (5): liberação fótons pelo intermediário quimicamente instável, ao retornar para o estado basal (THORPE e KRICKA, 1986).

Para cada curva de QLHRP determinou-se o valor da área integrada de 0 a 15 minutos, que foram empregados para o cálculo dos valores de porcentagem de inibição ou aumento da QLHRP de cada concentração em relação ao controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mecanismos de reação

5.1.1 Reação Substituição Nucleofílica seguida de Eliminação

Um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do trabalho é a reação de Substituição Nucleofílica seguida de Eliminação, caracterizada como um processo de segunda ordem onde a velocidade é proporcional à concentração do substrato e do nucleófilo. O mecanismo é apresentado a seguir: (Mcmurry, 2004)

Esquema15. Mecanismo de reação de substituição nucleofílica seguida de eliminação.

5.1.2 Reação de acoplamento cruzado (Buchwald-Hartwig) e Ativação C-H (Heterociclização de Åkermar-Knölker)

Um dos métodos para obtenção de diarilamina é a aminação de Buchwald-Hartwig, a qual cria ligações carbono-nitrogênio via acoplamento cruzado de haletos de arila ou triflatos com aminas.

O mecanismo da reação de Buchwald-Hartwig seguida de heterociclização de Åkermar-Knölker, para obtenção do anel carbazol, está apresentado no Esquema 16. A reação se inicia com adição oxidativa entre o paládio e o triflato de benzofenona-3. Na etapa seguinte, ocorre a ligação com a amina **B2c**, seguida por desprotonação e eliminação redutiva obtendo a diarilamina **B5** (Schmidt, Reddy e Knolker, 2012). No passo seguinte da reação, a formação do anel carbazol acontece via inserção oxidativa do paládio (II), gerando o complexo de paládio **B5a** seguido da formação do intermediário e eliminação redutiva do paládio do composto, gerando a ligação carbono-carbono do esqueleto carbazol **B6**. Essa reação é estequiométrica quando não utiliza agentes reoxidantes. Por isso, a utilização de oxidantes, como acetato de cobre II, possibilita a conversão da forma reduzida do paládio para a sua forma oxidada, tornando-se assim possível a utilização de quantidades catalíticas de acetato de paládio II.

Esquema 16. Mecanismo da reação Buchwald-Hartwig e Heterociclização para formação dos compostos B5 e B6.

5.2 Caracterização estrutural dos compostos

A Tabela 3 apresenta os rendimentos globais da última etapa reacional das substâncias obtidas, junto com algumas de suas características.

Tabela 3. Rendimento e características das substâncias obtidas.

Código	Substância	Rendimento %	Características
B2	Benzofenona-3 triflate	36	Sólido branco
B3	Carbonato de benzofenona-3	98	Óleo transparente
B4	Benzofenona	10	Óleo transparente
B5	Benzofenona-3 fenil amino	64	Óleo amarelo
B6	Carbazol da benzofenona-3 fenil amino	7	Sólido amarelo
B7	Aduto de benzofenona-3 e Succinato de alfa-tocoferol	70	Óleo transparente
T3	Alfa-tocoferamina	70	Óleo alaranjado
T4	Succinato de alfa-tocoferol	74	Sólido branco

A seguir, são apresentadas as análises espectroscópicas dos compostos de partida, benzofenona-3 e alfa-tocoferol, e dos compostos sintetizados. A numeração das moléculas foi dada para facilitar a compreensão e discussão dos resultados e não representa as numerações oficiais da IUPAC.

Espectro ^1H RMN da benzofenona-3: **Figura 6.** Estrutura da molécula da benzofenona-3 para análise dos resultados obtidos (**B1**)**Tabela 4.** Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B1**

Número	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
H-2	6.52, d (2.5)
H-6	6.43, dd (9.0, 2.5)
H-5, H-3', H-5'	7.50, m
H-4'	7.56, m
H-2', H-6'	7.63, m
H-1-OCH₃	3.87, s
H-3-OH	12.70, s

No espectro ^1H RMN da benzofenona-3 é possível observar os hidrogênios aromáticos na região entre δ 6,5 e δ 7,5, onde o duplete em δ 6,52 com J 2,5 Hz é característico do acoplamento em ‘meta’ do hidrogênio do carbono 2. O sinal do duplo duplete em δ 6,43 com J 9,0 Hz e δ 2,5 é referente aos acoplamentos em ‘orto’ e em ‘meta’ do hidrogênio do carbono 6. O sinal do multiplete em δ 7,50 corresponde provavelmente aos hidrogênios dos carbonos 5, 3’ e 5’, enquanto que o sinal do multiplete em δ 7,56 é referente ao hidrogênio do carbono 4’ e o multiplete em δ 7,63 corresponde aos hidrogênios dos carbonos 2’ e 6’. Já o sinal do simpleto em 3,87 corresponde aos hidrogênios da metoxila e o simpleto em δ 12,70, corresponde ao hidrogênio da hidroxila.

Espectro ^1H RMN do alfa-tocoferol **Figura 7.** Estrutura da molécula do alfa-tocoferol (**T1**)

Tabela 5. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **T1**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-4	2.61, t (6.8)
H-5'-CH₃, H-7'-CH₃, H-8'-CH₃	2.12, s, 6H; 2.17, s, 3H
H-3	1.79, m
H-4'-CH₃, H-8'-CH₃, H-12-CH₃, H-13'	0.87, m
2-CH₃, H-1', H-2', H-3', H-5', H-6', H-7', H-9', H-10', H-11', H-12'	1-1.6 m (Sendo que em 1.24, s, 3H, referente ao H-2-CH ₃)

O espectro HRMN do alfa-tocoferol não possui hidrogênios aromáticos por isto todas as sinais observadas nesta molécula estão na região abaixo de $\delta 6$, assim o sinal do tripeto em δ 2,61 com J 6,8Hz corresponde ao hidrogênio do carbono 4. Os sinais dos simpletos em δ 2,12 e δ 2,17 que integram para 9 hidrogênios correspondem aos hidrogênios metílicos dos carbonos 5', 7', 8'. O sinal do multipeto em δ 1,79 corresponde ao hidrogênio do carbono 3. O sinal do multipeto em δ 0,87 corresponde provavelmente aos hidrogênios metílicos dos carbonos 4', 8', 12 e 13. O sinal do multipeto entre δ 1 e 1,6 corresponde aos hidrogênios dos carbonos 1', 2', 3', 5', 6', 7', 9', 10', 11', e 12, sendo que o sinal do simpleto em δ 1,24 com integral para 3 hidrogênios corresponde aos hidrogênios metílicos ligados ao carbono 2.

5.2.1 Triflato de Benzofenona-3 (B2)

Figura 8. Estrutura da molécula de triflato de benzofenona-3 (**B2**)

Tabela 6. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B2**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-3	7.54, d (8.6)
H-4	6.97, dd (8.6, 2.4)
H-6	6.91, d (2.4)
H-2', H6'	7.77, m
H-3', H-5'	7.47, m
H-4'	7.60, m
H-5-OCH₃	3.91, s

A benzofenona-3 triflato (**B2**) foi obtida pela reação de benzofenona-3 com anidrido trifílico, utilizando as mesmas condições da rota sintética descrita no item 5.1.1. Sua obtenção foi comprovada por análise do espectro de RMN de hidrogênio (Anexo2). O hidrogênio ‘orto’ à hidroxila na molécula de benzofenona-3 pertencente ao carbono 2 com sinal em δ 6,52, corresponde ao hidrogênio do carbono 6 na molécula do triflato com sinal em δ 6,91, o que mostra a ocorrência de uma desblindagem produzida pelo grupo triflato. A desblindagem também pode ser observada nos hidrogênios das posições ‘orto’ e ‘meta’ aos substituintes (triflato e hidroxila), os quais correspondem aos hidrogênios dos carbonos 3 e 4 do **B2** com sinais em δ 7,54 e δ 6,97, e aos hidrogênios dos carbonos 5 e 6 do **B1** com sinais em δ 7,50 e δ 6,43.

5.2.2 Carbonato de Benzofenona-3 (**B3**)

Formiato de benzofenona-3
(2-benzoil-5-metoxifenil etil carbonato)

Figura 9. Estrutura da molécula de Carbonato de benzofenona-3 (**B3**)

Tabela 7. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B3**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-3	7.52, d (8.6)
H-4	6.84, dd (8.6, 2.3)
H-6	6.79, d (2.3)
H-2', H6'	7.74, t (7.4)
H-3', H-5'	7.44, t (7.6)
H-4'	7.55, t (7.4)
H-5-OCH₃	3.87, s
H-2''	1.26, t (7.1)
H-1''	4.18, q (7.1)

O carbonato de benzofenona-3 (**B3**) foi obtido através de uma reação de esterificação, utilizando clorocarbonato de etila, conforme a reação do item 4.2.1.2. A formação do produto foi comprovada por análise comparativa do espectro de RMN de hidrogênio de **B1** com **B3** (Anexo 1 e Anexo 4). Em **B3** pode-se observar o sinal do tripleto em δ 1,26, correspondente aos hidrogênios metilênicos e o sinal do quadrupeto em δ 4,18 correspondente aos hidrogênios metílicos do éster. Pode ser observada a desblindagem dos hidrogênios das posições 'orto' e 'para' aos substituintes (éster e hidroxila), os quais correspondem aos hidrogênios dos carbonos 6 e 4 do **B3** com sinais em δ 6,79 e δ 6,84, e aos hidrogênios dos carbonos 2 e 6 do **B1** com sinais em δ 6,52 e δ 6,43.

5.2.3 Benzofenona (**B4**)

((4-metoxi fenil)(fenil)metanona)

Figura 10. Estrutura da molécula de benzofenona (**B4**)

Tabela 8. Caracterização espectroscópica (^1H RMN e espectrometria de massas) de **B4**

Número		δ_{H} (J em Hz)
H-2, H-6		6.97,m
H-3, H-5		7.83, m
H-2', H-6'		7.76, m
H-3', H-5'		7.47, m
H-4'		7.57, m
H-1-OCH₃		3.89, s
Espectrometria de massas		
Massa	Massa	% Erro
Calculada	Obtida	
213,2512	213,0295	0,01
g/mol	g/mol,	

Para a obtenção da benzofenona (**B4**) foi realizada uma reação de aminação de Buchwald-Hartwig, como representada na Figura 10, a qual foi catalisada por acetato de paládio, tendo o XPhos (2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenil) como ligante. **B4** foi obtido pela reação de eliminação do grupamento triflato na tentativa de obtenção de um aduto com espaçador amino entre a benzofenona-3 (**B1**) e a alfa-tocoferamina (**T4**). A formação de **B4** foi confirmada ao analisar o espectro de massas e RMN (Anexo 5) deste composto. No espectro RMN de hidrogênio, foram observados os sinais do multipeto em δ 6,97, que provavelmente correspondente aos hidrogênios dos carbonos 2 e 6, que devido à influência do grupo doador de elétrons (metoxila) e retirador de elétrons (carbonila) apareceram nas regiões mais blindadas do espectro. O mesmo efeito do substituinte deslocou os hidrogênios dos carbonos 3 e 5 com sinal de multipeto em δ 7,83, para regiões mais desblindadas. A molécula de **B4** não apresenta sinal na região de δ 12 confirmando a ausência da hidroxila na posição 3. A massa calculada para a molécula protonada do composto **B4** é 213,2512 g/mol e a massa obtida foi 213,0295 g/mol, sendo a porcentagem de erro calculado de 0,01% (Anexo 6).

Para a obtenção do **B4** foi necessário, inicialmente, a síntese de **T4**, como apresentado no item 4.2.1.3. A formação do composto **T4** foi confirmado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), conforme verificado no Anexo 11. A massa calculada para o íon molecular do composto **T4** é 429,3965 m/z e a massa obtida foi 429m/z.

5.2.4 Benzofenona-3 Fenil amino (B5)

Benzofenona-3 fenil amino

((4-metoxi -2-(fenilamino)fenil)(fenil)metanona)

Figura 11. Estrutura da molécula de benzofenona-3 fenil amino (**B5**)

Tabela 9. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B5**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-2	6.7, d (2)
H-6	6.15, dd (8.9, 2.4)
H-4''	7.02, m
H-2' H6'	7.54, m
H-5, H3' H-5', H-4', H-2'', H-6'', H-3'', H-5''	7.39, m (4H), 7.26, m (4H)
NH	10.54 s
H-1-OCH₃	3.66, s

A obtenção da benzofenona-3 fenil amino (**B5**) foi realizada através de uma aminação de Buchwald-Hartwig, catalisada por acetato de paládio, tendo o XPhos (2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenil) como ligante, conforme o item 4.2.1.4. A obtenção do **B5** foi confirmada pela análise de RMN de hidrogênio (Anexo 7). O efeito ativador dos grupamentos (amino e hidroxila) podem ser observado nos hidrogênios 'orto' e 'para' à esses substituintes. Assim, os hidrogênios dos carbonos das posições 2 e 6 ('orto' e 'para') de **B5** apresentam sinal em δ 6,7 e δ 6,15, enquanto que os hidrogênios dos mesmos carbonos de **B1** mostram sinal em δ 6,52 e δ 6,43, evidenciando a diminuição do efeito ativador da anilina devido ao fato de os elétrons do nitrogênio estarem sendo compartilhados com dois anéis aromáticos. O aparecimento de 5 hidrogênios a mais na região entre δ 7,26 e δ 7,39 ajudam a comprovação da obtenção do composto **B5**.

5.2.5 Carbazol da Benzofenona-3 Fenil amino (B6)

Carbazol de Benzofenona-3 fenil amino
((4-metoxi-9H-carbazol-1-il)(fenil)metanona)

Figura 12. Estrutura da molécula do carbazol da benzofenona-3fenil amino (**B6**)

Tabela 10. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B6**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-6	6.70, d (8.65)
H-5	8,32, d(7,37)
H-4' H3'	7.31, dt, (7.8, 1.06), 7.47, dt (8.19,1.25)
H-2'', H3'' H-5'', H-6''	7.55, m (4H),
H-2', H-5', H-4''	7.77, m (3H)
NH	10.63 s
H-1-OCH₃	4.19 s

A síntese do carbazol da benzofenona-3 fenil amino (**B6**) foi realizada através de uma heterociclicização, catalisada por paládio adaptada do trabalho de (Watanabe *et al.*, 2009), conforme o item 4.2.1.5 A obtenção do produto foi confirmada pela análise de RMN de hidrogênio (Anexo 8). A formação do anel do carbazol foi comprovada pela ausência do sinal em δ 6,7, que corresponde ao hidrogênio do carbono 2 da fenil amina (**B5**). A desblindagem produzida pelo efeito ativador do anel do carbazol pode ser observada nos hidrogênios das posições 5 e 6 de **B5** e **B6** com sinais em δ 8,32 e 6,68 e δ 7,39 e 7,26, respectivamente.

Os hidrogênios dos anéis A e D encontram-se na região entre δ 7,31 e δ 7,77 como multipletos. Já o hidrogênio do grupamento amino encontra-se em δ 10,63.

5.2.6 Aduto de Benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (B7)

Aduto de benzofenona-3 e succinato de alfa-tocoferol

(2-benzoil-5-metoxifenil (2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-il) succinato)

Figura 13. Estrutura da molécula do aduto de benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (B7)

Tabela 11. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **B7**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-2, H-3	2.85, t (6.9); 2.68, t (6.8)
H-5'-CH ₃ , H7'-CH ₃ , H8'-CH ₃	2.08, s; 1.98, s; 1.94, s
H-4'	2.57, t (6.5)
H-3'	1.78, m
H-4''-CH ₃ , 8''-CH ₃ , 12''-CH ₃ H13''	0.86, m
H2'-CH ₃ , H1'', H2'', H3'', H5'', H6'', H7'', H9'', H10'', H11'', H12''	1-1.6, m (Sendo que em 1.23, s, 3H, referente ao H-2'-CH ₃)
H-6*	6.7, d (2.2)
H-4*	6.84, dd (8.6, 2.1)
H-3*, H4**	7.55, m
H-2**, H-6**	7.73, d (7.5)
H-3**, H-5**	7.45, t (7.6)

A síntese do aduto de benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (**B7**) foi realizada seguindo rota sintética descrita no item 4.2.1.6. A obtenção do produto foi comprovada por análise de RMN de hidrogênio (Anexo 9). No espectro da molécula podem ser observados os sinais aromáticos da porção referente à benzofenona-3 (Anexo 1) na região mais desblindada do espectro (δ 6,50 – 7,73). Os hidrogênios dos carbonos 6*, 4* e 3* em (δ 6,79, δ 6,84 e δ 7,52) mostram a mesma desblindagem dos hidrogênios dos carbonos 6, 4 e 3 da molécula carbonato de benzofenona-3 (**B3**), devido ao efeito do substituinte.

Os sinais da porção da molécula proveniente do succinato de alfa tocoferol (**T5**) (Anexo 12) na região compreendida entre $\delta 0$ e $\delta 3$, são compatíveis com o padrão de succinato. O efeito retirador de elétrons da carboxila do éster é observado ao comparar o deslocamento, para as regiões mais desblindadas, dos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 de **B7**, com sinais de tripleto em $\delta 2,85$ e $\delta 2,68$ com os hidrogênios dos mesmos carbonos do **T5**, com sinais de tripleto em $\delta 2,92$ e $\delta 2,82$

Para a síntese de **B7** foi necessário, inicialmente, a obtenção da molécula **T5**, conforme apresentado no item 4.2.1.6, através da reação de esterificação entre o anidrido succínico e o alfa-tocoferol (Coulalova *et al.*, 2013) a síntese é apresentada no esquema 13.

Succinato de alfa-tocoferol

ácido 4-oxo-4-((2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-il)oxi)butanoico

Figura 14. Estrutura da molécula do succinato de alfa-tocoferol (**T5**)

Tabela 12. Caracterização espectroscópica (^1H RMN) de **T5**

Número	δ_{H} (J em Hz)
H-2 H-3	2.93, t (6.5); 2.82, t (6.5)
H-5'-CH₃, H7'-CH₃, H8'-CH₃	2.08, s; 2.01, s; 1.97, s
H-4'	2.58, t (6.7)
H-3'	1.79, m
H-4''-CH₃, 8''-CH₃, 12''-CH₃, H13''	0.86, m
2'-CH₃, H1'', H2'', H3'', H5'', H6''	1-1.6, m (Sendo que em 1.25, s, 3H,
H7'', H9'', H10'', H11'', H12''	referente ao H-2'-CH ₃)

A obtenção do composto **T5** foi confirmada por análise do espectro de ^1H RMN (Anexo 12). Pôde ser observado o aparecimento dos dois tripletos em $\delta 2,82$ e $\delta 2,93$, que correspondem aos hidrogênios metilênicos oriundos do anidrido succínico. Os sinais do restante da molécula são compatíveis com os sinais encontrados para a molécula do alfa tocoferol (Anexo 10).

5.3 Determinação do espectro de absorção no ultravioleta

A análise realizada no espectro de absorção na região do UV permitiu a determinação de alguns parâmetros das substâncias, como:

- Coeficiente de absortividade molar (ϵ)
- Razão UVA/UVB
- Comprimento de onda crítico (λ_c)
- Comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$)

Uma vez obtidos estes valores para cada substância foi possível avaliar a eficácia de cada.

5.3.1 Avaliação do efeito dos substituintes na absorção ultravioleta

Para a avaliação do efeito dos substituintes, os parâmetros utilizados foram: o comprimento de onda máximo e o coeficiente de absortividade molar. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15 e na Tabela 13.

Figura 15. Estrutura do cromóforo de benzofenona

Tabela 13. Avaliação do efeito dos substituintes no espectro de absorção ultravioleta na molécula de benzofenona-3. B1: Benzofenona-3, B2: Benzofenona-3 triflato, B3: Carbonato de benzofenona-3, B4: Benzofenona, B5: Benzofenona-3 fenil amino, B6: Carbazol da benzofenona-3 fenil amino, B7: Aduto de benzofenona-3 e Succinato de alfa-tocoferol.

Código	R	UV			
		B I (nm)	ϵI ($M^{-1} cm^{-1}$)	B II (nm)	ϵII ($M^{-1} cm^{-1}$)
B1	OH	284	12933,3	330	8666,6
B2		255	3.183,3	-	-
B3		275	26.400,0	-	-
B4	H	277	13.666,6	-	-
B5		272	20866,6	378	5133,3
B6		293	7333,3	362	4800
B7		281	10.066,6	-	-

Figura 16. Espectro de absorção no UV para as soluções 1,5 μM em isopropanol. B1: Benzofenona-3, B2: Benzofenona-3 triflato, B3: Carbonato de benzofenona-3, B4: Benzofenona, B5: Benzofenona-3 fenil amino, B6: Carbazol da benzofenona-3 fenil amino, B7: Aduto de benzofenona-3 e Succinato de alfa-tocoferol

O espectro de absorção no ultravioleta para a benzofenona-3 apresenta duas bandas características, uma em 280 e outra 320 nm (Hrdlovic e D.Bellus, 2014).

As bandas de absorção na molécula de benzofenona-3 são atribuídas a diferentes partes da molécula. A banda de absorção entre 260 – 300 nm é produzida pela interação entre o grupamento doador de elétrons OH e o substituinte na posição ‘*para*’ a esse grupamento (OCH₃) (Tsekhanskii, 1968)

A absorção nos comprimento de onda entre 300-400 nm é produzida pela interação do grupo doador de elétrons, hidroxila na posição ‘*orto*’, com o grupamento carbonila como apresentado no esquema 17 (Castro, Blanco e Giordano, 2000).

Esquema 17. Ressonância entre a hidroxila e a carbonila.

Portanto, a influência dos substituintes foi avaliada alterando o grupamento doador de elétrons da posição 3 da molécula (Esquema 17). Os resultados mostraram que em **B3**, **B4**, **B5** e **B7** a banda de absorção entre 250 nm e 300 nm proveniente do cromóforo benzofenona é mantida. No entanto, o valor de coeficiente de absortividade molar (ϵ) destas moléculas apresentou variação, provavelmente devido a presença dos diferentes grupamentos na posição *orto* à carbonila. Ao comparar os coeficientes de absortividade molar das moléculas **B3**, **B4**, **B5** e **B7** (ϵ 26400, 13666,6, 20866,6 e 10066 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente) observou-se que os grupamentos carboxila (éster) de cadeia curta (**B3**) e fenil (**B5**) interagem com o cromóforo aumentando a absortividade da molécula. Já o grupamento carboxila do éster de cadeia maior (**B7**) não interage tanto com a molécula de benzofenona e por isto apresentou um valor de absorção próximo ao obtido para B4 que não apresenta nenhum substituinte na posição *orto* à carbonila.

A interação entre o grupamento carbonila em estado excitado e o hidrogênio da amina manteve a absorção na faixa compreendida entre 300-400 nm, por isso somente as moléculas **B5** e **B6** apresentaram absorção nesta faixa, o que não foi observado nas moléculas **B2**, **B3** e **B7**, uma vez que a adição desses grupamentos á benzofenona-3 fez ocorresse a perda da ponte de hidrogênio intramolecular. Outros autores relataram o mesmo comportamento, observado no presente estudo, quando analisaram a influência da ponte hidrogênio na absorção dos

salicilatos (Shaath, 2010). Em **B5** foi adicionado um anel aromático não conjugado, que não influencia na absorção característica do cromóforo inicial, ou seja, essa molécula ainda apresenta duas bandas de absorção (272nm e 378nm). No entanto, o efeito elétron doador do grupamento anímo provocou um deslocamento batocrômico na absorção de **B5** quando comparado com **B1**.

A molécula **B6** apresentou alterações importantes no espectro de absorção UV, quando comparada com suas moléculas precursoras, ou seja, apresentou um deslocamento batocrômico em relação a **B1**. Pode ser observado que a formação do anel carbazol em **B6** gerou um novo cromóforo com bandas de absorção e coeficiente de absorvidade molar característicos (Khdaire *et al.*, 2010; Khoza, Antunes e Nyokong, 2013; 2014). A absorção dos carbazóis entre 300 e 400 nm e a quantidade de energia absorvida favorece a sua utilização na terapia fotodinâmica para tratamento de doenças da pele (Tzanova *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2011; Khoza, Antunes e Nyokong, 2014).

As moléculas **B2**, **B3**, **B4** não mostraram absorção na região entre 320-400 nm, pois não apresentam ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila.

Figura 17. Avaliação do efeito dos solventes sobre as substâncias com absorção no UVA. Benzofenona-3 (**B1**)(a), Benzofenona-3 Fenil amino (**B5**)(b) e Carbazol da benzofenona-3 fenil amino **B6**(c).

Tabela 14. Coeficientes de absorvidade molar para a benzofenona-3 (**B1**) em diferentes solventes: DMSO, Hexano, Metanol (MeOH) e Isopropanol.

<i>Solvente</i>	<i>Banda I (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	<i>Banda II (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
DMSO	330	15400	285	15733,3
Hexano	330	10333,3	283	7733,3
MeOH	330	8933,3	285	8200
Isopropanol	330	8000	285	8666,6

Tabela 15. Coeficientes de absorvidade molar para a benzofenona-3 fenilamino (**B5**) em diferentes solventes: DMSO, Hexano, Metanol (MeOH) e Isopropanol.

<i>Solvente</i>	<i>Banda I (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	<i>Banda II (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
DMSO	382	24933,3	274	6266,6
Hexano	382	19266,6	274	6400
MeOH	382	17066,6	274	5200
Isopropanol	382	20866,6	274	5133,3

Tabela 16. Coeficientes de absorvidade molar para o carbazol da benzofenona-3 fenilamino (**B6**) em diferentes solventes: DMSO, Hexano, Metanol (MeOH) e Isopropanol

<i>Solvente</i>	<i>Banda I (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	<i>Banda II (nm)</i>	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
DMSO	362	15200	293	9133,3
Hexano	362	49266,6	293	19666,6
MeOH	362	11866,6	293	7466,6
Isopropanol	362	7333,3	293	4800

Partindo da hipótese que os solventes são de grande importância para o desenvolvimento de processos tecnológicos e biológicos, bem como para o sucesso das reações químicas (Suppan, 1990) o estudo do efeito dos solventes nas propriedades das moléculas sintetizadas, foi abordado no trabalho.

Os resultados mostraram que o DMSO apresentou maior influência nos valores de absorvidade molar para B1 e B5, devido às interações moleculares estabelecidas entre o

solvente e o soluto (Dilling, 1965). Por outro lado, o hexano apresentou maior influência para B6.

Foi observado também que quando em soluções próticas (metanol e isopropanol), as moléculas também não apresentaram aumento significativo do coeficiente de absorvidade molar. Esse resultado descarta a hipótese de que, para as moléculas B1, B5 e B6, a interação dos anéis com solvente próticos contribuía significativamente para quantidade de energia absorvida pelas mesmas. Dessa forma, esses solventes podem ser utilizados em outros ensaios biológicos sem afetar os resultados destes ensaios.

5.3.2 Avaliação da absorção no UVA

A avaliação do nível de proteção UVA foi realizada em soluções das moléculas com concentração de 1,5µM. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Avaliação da absorção UVA das moléculas sintetizadas. A categoria e o nível de proteção estão baseados no Sistema Boot's Star Rating (BALOGH *et al.*, 2011)

<i>Molécula</i>	<i>Código</i>	λ_c (nm)	<i>Razão</i> UVA/UVB	<i>Categoria</i>	<i>Nível de proteção</i> (UVA)
Benzofenona-3	B1	353	0,70	Superior ***	Intermediária
Benzofenona-3 Triflato	B2	293	0,10	Muito baixa	-
Carbonato de Benzofenona-3	B3	309	0,05	Muito baixa -	-
Benzofenona	B4	298	0,23	Moderada *	-
Benzofenona-3 Fenil amino	B5	396	> 0,9	Ultra *****	Maior
Carbazol	B6	369	> 0,9	Ultra *****	Maior
Aduto de Benzofenona-3	B7	305	0,11	Muito Baixa-	-

De acordo com o *Boot's Star Rating System* (Balogh *et al.*, 2011), as substâncias **B1**, **B5** e **B6** apresentaram proteção UVA, sendo que **B5** e **B6** obtiveram um valor de 5 estrelas, apresentando ultraproteção no UVA e razão UVA/UVB > 0,9.

As moléculas **B2**, **B3**, **B4** e **B7** não apresentaram absorção na faixa 320 – 400 nm; possuem, ainda, baixa razão UVA/UVB e quase nenhuma proteção UVA. Dessa forma, somente as moléculas **B5** e **B6** teriam potencial para serem utilizadas como filtros solares.

5.4 Avaliação da fotoestabilidade

A determinação da fotoestabilidade foi realizada em soluções das substâncias sintetizadas, com uma faixa de concentração variando entre 3 μ M e 2mM. Os resultados estão apresentados na Tabela 18 e na Figura 18.

Tabela 18. Integral do espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA e do UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação.

Amostra Código	$\int_{320}^{400}$ UVA		$\int_{280}^{320}$ UVB		RAZÃO UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB
	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	não irradiado	irradiado	
B1	56,65	66,43	83,203	95,09	0,68	0,69	-0,01
	68,79	64,77	105,95	91,86	0,64	0,70	-0,06
	68,12	69,90	101,51	94,46	0,67	0,74	-0,07
Média	64,52	67,03	96,88	93,80	0,66	0,71	-0,05
B3	4,88	0,95	13,21	11,01	0,37	0,08	0,29
	5,59	0,95	14,04	10,63	0,39	0,08	0,31
	4,79	0,95	13,14	10,08	0,36	0,09	0,27
Média	5,08	0,95	13,46	10,57	0,37	0,08	0,29
B4	6,13	3,83	26,47	20,90	0,23	0,18	0,05
	6,83	3,16	20,95	18,69	0,32	0,16	0,16
	6,93	3,47	20,95	19,61	0,33	0,17	0,16
Média	6,63	3,48	22,79	19,73	0,29	0,16	0,12
B5	60,84	59,81	62,98	59,94	0,96	0,99	-0,03
	61,12	56,52	60,99	56,42	1,00	1,00	0,00
	61,55	58,65	61,67	58,65	0,99	0,99	0,03
Média	61,17	58,32	61,88	58,33	0,98	0,99	0,00
B6	9,56	10,07	11,72	11,46	0,81	0,87	-0,06
	10,05	09,94	11,08	10,77	0,90	0,92	-0,02
	10,86	10,70	10,58	10,91	1,02	0,98	0,04
Média	10,15	10,23	11,12	11,04	0,91	0,92	-0,01
B7	6,65	1,79	3,36	2,60	1,97	0,68	1,29
	6,58	1,48	3,32	2,29	1,98	0,65	1,33
	6,70	1,45	3,32	1,82	2,01	0,79	1,30
Média	6,64	1,57	3,33	2,23	1,98	0,70	1,30
Avobenzona	80,38	43,04	18,31	18,05	4,38	2,38	2,00
	83,81	43,60	16,43	16,69	5,10	2,61	2,49
	93,40	37,18	16,17	16,34	5,70	2,27	3,43
Média	85,86	41,27	16,97	17,02	5,06	2,42	4,13

Figura 18. Avaliação da fotoestabilidade. Espectro de absorção das amostras das formulações na faixa do UVA e do UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não à irradiação. Linhas pontilhadas são as soluções irradiadas. Linhas contínuas são soluções não irradiadas. (a) Avobenzone, (b) Benzofenona -3, B1, (c) CarbonatoFormiato de benzofenona -3 , B3, (d) Benzofenona, B4, (e) benzofenona -3 fenil amino, B5, (f) Carbazol da benzofenona -3 fenil amino, B6, (g) Aduto da benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol, B7

De acordo com a análise estatística as moléculas ABZ, **B3**, **B4** e **B7** foram consideradas fotoinstáveis, pois houve redução significativa da razão UVA/UVB ($p < 0,01$) após irradiação por UVA (Figura 18 e Tabela 18). Tal redução, pode ser devido à ausência, nessas moléculas, da ligação de hidrogênio necessária para a formação do sistema conjugado entre a carbonila e o hidrogênio do substituinte na posição 3, uma vez que, as moléculas **B1**, **B5** e **B6** apresentavam o sistema conjugado gerado pela ligação de hidrogênio e não sofreram redução da razão UVA/UVB ($p > 0,01$), sendo consideradas fotoestáveis.

5.5 Avaliação da fototoxicidade

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade à radiação estão apresentados na Tabela 20, onde se pode observar que as células apresentam viabilidade dentro dos critérios de aceitação determinados no estudo de validação, ou seja, uma viabilidade celular de pelo menos 80% quando as células foram submetidas a uma dose de 5 J/cm^2 (OECD, 2002).

Tabela 19. Sensibilidade dos fibroblastos a radiação UVA.

Dose (J/cm^2)	Viabilidade Celular (% em relação ao UVA)
3	93,6
5	81,6
9	72,4

Tabela 20. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das substâncias isoladas em cultura de fibroblastos (N = 2)

Substância	Run	IC50 -UV	IC50 +UV	PIF	MPE	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
B1	1	59,004	58,078	1,016	0,023	Não fototóxico
	2	58,0452	61,864	0,945	-0,069	
B2	1	18,708	2,616	6,430	0,711^b	Fototóxico
	2	-	-	2,357	1,329^b	
B3	1	-	17,888	5,595	0,365^b	Fototóxico
	2	-	16,502	6,069	0,384^b	
B5	1	46,694	36,588	1,281	0,027	Não fototóxico
	2	46,694	51,624	0,916	0,044	
B6	1	62,19	24,13	2,80	0,119^a	Fototóxico
	2	57,66	20,615	2,602	0,241^b	
B7	1	-	-	1,000	0,083	Não fototóxico
	2	-	59,335	1,000	0,117 ^a	
Norfloxacina	1	-	35,404	2,833	0,219^b	Fototóxico
	2	-	52,391	1,911	0,181^b	
Avobenzona	1	-	23,782	4,205	0,340^b	Fototóxico
	2	-	10,00	9,970	0,422^b	

Um PIF maior que 2 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. **a:** Provavelmente fototóxico. **b:** Fototóxico. – Não determinado.

A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das substâncias em estudo, classificadas como não fototóxicas e provavelmente fototóxicas, sendo a norfloxacina usada como controle positivo, as quais foram geradas pelo Software Phototox versão 2.0 (Figura 19).

Figura 19. Curva dose resposta das substâncias em estudo. Benzofenona -3 (B1), Carbonato de benzofenona -3 (B3), benzofenona -3 fenil amino (B5), Carbazol da benzofenona -3 fenil amino (B6), Aduto da benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol (B7)

Os resultados dos estudos de fototoxicidade para os derivados de benzofenona-3 mostraram que as moléculas B2, B3 e B6 apresentaram potencial fototóxico (MPE_{B2} : 0,711 e 1,329, MPE_{B3} : 0,365 e 0,384, MPE_{B6} 0,119 e 0,241). Já as moléculas B5 e B7 (MPE_{B5} : 0,027 e 0,044, MPE_{B7} : 0,083 e 0,117) foram classificadas como não fototóxicas.

A molécula **B2** apresentou alta fototoxicidade provavelmente devido ao grupo triflato ligado à benzofenona-3, uma vez que esse grupo é utilizado como intermediário para a formação de novos compostos. As moléculas **B3** e **B6** apresentam alta fototoxicidade, entretanto possuem alta absorção no UVB e no UVA longo, respectivamente. Dessa forma, apesar de terem sido consideradas fototóxicas, podem não apresentar fototoxicidade *in vivo*, pois a biodisponibilidade também deve ser levada em consideração para prever o potencial fototóxico de uma substância.

Estudos anteriores mostram que os resultados obtidos com óleo de bergamota no estudo de fototoxicidade 3T3 NRU PT em monocamadas e em modelo de pele humana reconstituída apresentaram uma boa correlação, ou seja, o óleo de bergamota de 2 diferentes fabricantes foi classificado como potencialmente fototóxico no teste 3T3 e a sua fototoxicidade foi confirmada nos ensaios no modelo de pele reconstituída (Kejlová *et al.*, 2007). Entretanto, essa correlação entre os resultados obtidos nos estudos em cultura de células e na pele reconstituída não foi observada quando associações contendo diferentes filtros solares combinados à avobenzona foram avaliadas, pois, apesar dessas associações terem sido classificadas como potencialmente fototóxicas no teste 3T3, elas não apresentaram fototoxicidade nos ensaios no modelo de pele reconstituída, o que, provavelmente pode ter ocorrido devido à sua baixa biodisponibilidade desses filtros solares na epiderme viável (Gaspar *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que os carabazóis já são utilizados na terapia fotodinâmica (Khdaier *et al.*, 2010; Khoza, Antunes e Nyokong, 2013; 2014), o que permite sugerir que **B6** tenha potencial para uso em formulações tópicas para tal finalidade.

Alguns autores que estudaram a relação estrutura / atividade estrogênica da benzofenona-3 mostraram que a sua atividade estrogênica está relacionada com a hidroxila na posição 3 da molécula (Kerdivel *et al.*, 2013). Dessa forma, a diminuição da rotação e a liberdade do próton da ponte de hidrogênio de **B5** e **B6**, também permite sugerir que provavelmente essas moléculas tenham atividade estrogênica menor que **B1**.

5.6 Avaliação da atividade antioxidante

Os antioxidantes podem desempenhar um papel significativo na melhoria ou prevenção dos danos causados na pele pela radiação solar. Dentre alguns fenóis naturais, as hidroxibenzofenonas são metabólitos com atividade antioxidante presentes em plantas. O garcinol, isolado de *Garcinia benzofenona* mostrou que a hidroxila da molécula têm um papel importante na eliminação de radicais livres, sendo capaz de proteger até as células da medula óssea dos efeitos de substâncias pró-oxidantes. (Tzanova *et al.*, 2009)

De um modo geral, os fenóis possuem um papel importante na biologia, pois podem atuar como agentes de quebra de cadeia, ou como antioxidantes na peroxidação induzida por radicais livres (Belluti *et al.*, 2014).

Assim, foi realizado o estudo da atividade antioxidante sobre a reação enzimática HRP-H₂O₂-luminol das moléculas sintetizadas, sendo que, dos derivados de benzofenona em estudo, somente **B1** e **B5** apresentaram atividade antioxidante.

No estudo da atividade antioxidante das substâncias foi realizado, inicialmente, o screening para a determinação de tal atividade em altas concentrações (500µmol/L). Os resultados mostraram que as substâncias **B3**, **B4** e **B7** apresentaram baixa porcentagem de inibição da reação -H₂O₂-luminol (QLHRP), enquanto que além dos padrões (P1, P2 e P3), somente as substâncias **B1** e **B5** apresentaram potencial de inibição maior que 50%. A porcentagem de inibição pelas substâncias em estudo estão apresentados na Tabela 21.

Nesse sentido, foi avaliada a relação entre a porcentagem de inibição da enzima HRP e a concentração somente para as moléculas **B1** e **B5**, além dos padrões (resveratrol, delta-tocoferol e alfa-tocoferol). A molécula **B6** também foi avaliada devido aos resultados promissores em relação à absorção no UVA longo.

Tabela 21. Porcentagem de inibição ou aumento da quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol (QLHRP), na presença de 500 µmol/L dos derivados de benzofenona-3.

Código	Substituente (R)	Inibição da QL ^{HRP} (%) ^(a)
B1	OH	59,00 ± 0,96
B4	H	3,97 ± 0,88
B3		4,64 ± 0,53
B5		52,3 ± 7,00
B6		28,00 ± 8,78
B7		28,22 ± 1,50
Resveratrol (P1)		> 90
Delta-tocoferol (P2)		83,00 ± 2,97
Alfa-tocoferol (P3)		37,15 ± 1,77

(a) Valores expressos como média ± DP da porcentagem de inibição ou de aumento da QLHRP em relação ao controle (DMSO), para dois experimentos com medidas em triplicata. Abreviaturas: DMSO: dimetilsulfóxido; DP: desvio padrão; HRP: horseradish peroxidase; QLHRP: quimioluminescência gerada pela reação HRP-H₂O₂-luminol.

Figura 20. Atividade antioxidante em função da concentração dos padrões (P1, P2 e P3) e dos derivados de benzofenona-3 (B1, B5 e B6)

Tabela 22. Concentração dos análogos de benzofenona-3 que promoveu 50% de inibição (CI50) da QLHRP (quimioluminescência produzida pela reação HRP-H₂O₂-luminol).

Código	Substituinte	CI50 (μmol/L) ^(a)
B1	OH	144,2
B5		429,7
Resveratrol (P1)		7,54
Delta- tocoferol (P2)		90,4

(a) Valores expressos como média $\pm$ DP de três experimentos, com medidas realizadas em duplicata. Abreviaturas: CI50: concentração que promove 50% de inibição da resposta biológica; DP: desvio padrão; HRP: horseradish peroxidase; QLHRP: quimioluminescência produzida pela reação HRP-H₂O₂-luminol.

O resultado dos padrões mostra que, quanto mais grupos hidroxila na molécula, maior é a sua atividade antioxidante. Assim o resveratrol apresentou um IC 50 de 7,54 μM, enquanto que o delta-tocoferol por conter apenas um grupo hidroxila apresentou IC50 de 90,4 μM. A determinação do IC50 do alfa tocoferol não foi possível, uma vez que ele apresentou baixa atividade antioxidante, provavelmente devido ao impedimento estérico da hidroxila pelos grupamentos metílicos do anel, que dificultam a reação sua reação com radicais livres (Figura 20).

A mesma comparação entre a atividade antioxidante e a estrutura molecular também foi observada para as substâncias **B1**, **B5** e **B6**. Assim, pode-se afirmar que quanto maior o impedimento estérico sobre o grupamento doador de prótons, maior foi valor de IC50, conforme Tabela 23.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos iniciais do projeto foram atingidos uma vez que a **B5** (Benzofenona-3 fenil amino) apresentou alta absorção no UVA longo e alto comprimento de onda crítico (396 nm) o que a caracteriza como um bom candidato a filtro solar, que apresenta amplo espectro de absorção, inclusive no UVA. Além disso, essa substância foi considerada fotoestável e ainda não apresentou potencial fototóxico, o que sugere seu grande potencial para utilização como novo filtro solar. Por outro lado a redução da sua atividade antioxidante, quando comparada a **B1**, atividade 3,7 vezes menor que **B1**, não inviabiliza sua aplicação como filtro solar uma vez que esta propriedade apesar de ser desejável não é o principal mecanismo de ação de um filtro solar.

Foram sintetizadas, com sucesso, seis moléculas derivadas de benzofenona-3 das quais duas apresentaram absorção na faixa do UVA. As estruturas dos derivados obtidos são apresentadas embaixo:

Benzofenona-3 triflato, **(B2)** Formiato de Benzofenona-3, **(B3)** Benzofenona **(B4)** Benzofenona-3 fenil amino **(B5)** Carbazol de Benzofenona-3 **(B6)** Aduto de Benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol, **(B7)**

Figura 21. Moléculas obtidas no desenvolvimento do projeto

Os resultados permitiram demonstrar a importância da relação entre a estrutura molecular dos compostos e sua absorção no UV.

Dessa forma, as moléculas benzofenona-3 fenil amino (**B5**) e o carbazol da benzofenona-3 fenil amino (**B6**) apresentaram maior absorção no UVA, longo e curto, e no UVB, quando comparadas com a molécula de partida (benzofenona-3) devido ao efeito doador de elétron do grupamento amino nas duas moléculas e ainda pela presença do anel carbazol em **B6**. Assim, esses fatores contribuíram para que tais moléculas fossem classificadas com nível de ultra proteção UVA, de acordo com o Boot Star Rating System.

No ensaio de fotoestabilidade, assim como na avaliação do espectro no UV, somente as substâncias que apresentavam ponte de hidrogênio intramolecular foram consideradas fotoestáveis.

Em relação ao teste de fototoxicidade (3T3 NRU), somente a molécula **B5** não apresentou potencial para fototoxicidade aguda, enquanto que as moléculas **B2**, **B3** e **B6** foram consideradas fototóxicas.

Na avaliação da atividade antioxidante, somente as moléculas **B5** e **B1** (Benzofenona-3 Fenil amino e benzofenona- 3, respectivamente) apresentaram tal atividade. No entanto, a atividade antioxidante de **B5** foi menor que a de **B1**, provavelmente devido ao impedimento estérico em **B5** sobre o grupamento doador de prótons.

Na análise geral dos resultados, pode-se concluir que a molécula **B5** (Benzofenona-3 Fenil amino) apresentou absorção no UVA longo e também foi classificada com nível de ultra de proteção UV. A molécula ainda foi considerada fotoestável e não apresentou potencial fototóxico, o que sugere o seu grande potencial para utilização com filtro solar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSANTE, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29-37, 1/10/ 2007. ISSN 0169-409X.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06002730> >.

ANTILLE, C. et al. Vitamin A exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet B radiation. **J Invest Dermatol**, v. 121, n. 5, p. 1163-7, Nov 2003. ISSN 0022-202X (Print)0022-202x.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12519.x> >.

ANVISA. (ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RESOLUÇÃO RDC Nº 30, DE 01 de JUNHO de 2012**). Brasil: 18 p..

AVANAKI, M. R. N.; HOJJATOLESLAMI, A. Skin layer detection of optical coherence tomography images. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v. 124, n. 22, p. 5665-5668, 11// 2013. ISSN 0030-4026.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030402613005196> >.

BALOGH, T. S. et al. Proteção da radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 08/2011 2011. ISSN 0365-0596.

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0365-05962011000400016&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

BELLUTI, F. et al. Fluorinated benzophenone derivatives: balanced multipotent agents for Alzheimer's disease. **Eur J Med Chem**, v. 78, p. 157-66, May 6 2014. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.042> >.

BENSON, H. A. Assessment and clinical implications of absorption of sunscreens across skin. **Am J Clin Dermatol**, v. 1, n. 4, p. 217-24, Jul-Aug 2000. ISSN 1175-0561 (Print)1175-0561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BIANCHI, M. D. L. P. et al. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 08/1999 1999. ISSN 1415-5273.

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415-52731999000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

BONDA, C. A.; PAVLOVIC, A. Photostabilizing electronic excited state energy particularly singlet state energy from UV-absorbing molecule has been found to be readily transferred to alpha-cyanodiphenylacrylate compounds having an alkoxy radical in four position on phenyl

rings; increases UV absorbing life of sunscreen agent. United States Patent, US7597825 B2, 200, outubro 6.

BOWMAN, A. et al. The simultaneous detection of mitochondrial DNA damage from sun-exposed skin of three whale species and its association with UV-induced microscopic lesions and apoptosis. **Mitochondrion**, v. 13, n. 4, p. 342-349, 7// 2013. ISSN 1567-7249. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724913000664> >.

CASTRO, G. T.; BLANCO, S. E.; GIORDANO, O. S. UV Spectral Properties of Benzophenone. Influence of Solvents and Substituents. **Moleucles**, 2000, V5, Disponível em: < <http://core.kmi.open.ac.uk/display/17456356> >.

CASTRO, I. A. **Expressão da proteína P53 em diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele**. 2007. 75 (Mestrado). Programa de Pos-Graduação em Medicina:Ciências medicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 01/11/2012 2012. ISSN 0190-9622.

Disponível em: < <http://www.jaad.org/article/S0190962212001314/abstract> >

COUFALOVA, L. et al. New propanoyloxy derivatives of 5beta-cholan-24-oic acid as drug absorption modifiers. **Steroids**, v. 78, n. 5, p. 435-53, May 2013. ISSN 0039-128x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.02.001> >.

CRIADO, C.; MOYA, M. **Vitaminas y Antioxidantes**. Madrid: Sanidad y Ediciones, 2009.

CÉSARINI, J. P. et al. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, n. 4, p. 182-189, 2003. ISSN 1600-0781.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0781.2003.00044.x> >.

DAMIANI, E. et al. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, n. 3, p. 204-213, 3/1/ 2006. ISSN 1011-1344.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134405002381> >.

DE LAURENTIIS, E. et al. Photochemical processes involving the UV absorber benzophenone-4 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulphonic acid) in aqueous solution: Reaction pathways and implications for surface waters. **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5943-5953, 10/1/ 2013. ISSN 0043-1354.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135413005897> >.

DEFLANDRE, A.; LANG, G. Photostability assessment of sunscreens. Benzylidene camphor and dibenzoylmethane derivatives. **Int J Cosmet Sci**, v. 10, n. 2, p. 53-62, Apr 1988. ISSN 0142-5463 (Print)0142-5463. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2494.1988.tb00002.x> >.

DIFFEY, B. L. A method for broad spectrum classification of sunscreens. **Int J Cosmet Sci**, v. 16, n. 2, p. 47-52, Apr 1994. ISSN 0142-5463 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-2494.1994.tb00082.x> >.

DURE, L. S.; CORMIER, M. J. Studies on the bioluminescence of *balanoglossus biminensis* extracts. 3. a kinetic comparison of luminescent and nonluminescent peroxidation reactions and a proposed mechanism for peroxidase action. **J Biol Chem**, v. 239, p. 2351-9, Jul 1964. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ECVAM. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay DB-ALM Protocol n° 78. 2014.

Disponível em: < http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/public_view_doc2.cfm?id=736F27E9E9F7A9D869FB48087878D2497180BB0BC12CB10496CDA74B54630A05A3291B895581F634 >.

FOURTANIER, A.; MOYAL, D.; SEITE, S. Sunscreens containing the broad-spectrum UVA absorber, Mexoryl SX, prevent the cutaneous detrimental effects of UV exposure: a review of clinical study results. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 24, n. 4, p. 164-74, Aug 2008. ISSN 0905-4383. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00365.x> >.

FRYER, M. J. EVIDENCE FOR THE PHOTOPROTECTIVE EFFECTS OF VITAMIN E. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 2, p. 304-312, 1993. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb09566.x> >.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 10/1/ 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307004541> >.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 123-128, 1/13/ 2006. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305006496> >.

GASPAR, L. R. et al. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 418-425, 2013. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088723331200210X> >.

GEHRING, W.; FLUHR, J.; GLOOR, M. Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. **Arzneimittelforschung**, v. 48, n. 7, p. 772-5, Jul 1998. ISSN 0004-4172 (Print)0004-4172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GONZALEZ, H. Percutaneous absorption with emphasis on sunscreens. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 482-488, 2010. ISSN 1474-905X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B9PP00149B> >.

GUPTA, V. K.; ZATZ, J. L.; REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin in vitro. **Pharm Res**, v. 16, n. 10, p. 1602-7, Oct 1999. ISSN 0724-8741 (Print)0724-8741. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUSTAVSSON GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKO, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clin Exp Dermatol**, v. 27, n. 8, p. 691-4, Nov 2002. ISSN 0307-6938 (Print)0307-6938. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HAYDEN, C. G. J.; ROBERTS, M. S.; BENSON, H. A. E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **The Lancet**, v. 350, n. 9081, p. 863-864, 9/20/ 1997. ISSN 0140-6736.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605620326> >.

HAYWOOD, R. et al. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma? , v. 121, n. 4, p. 862-868, 09/25/online 2003. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12498.x> >.

HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A. **Análise Instrumental**. Bookman companhia editora LTDA, 1056 p, 2009.

HRDLOVIC, P.; BELLUS, D. Effect of Substituents on Ultraviolet Absorption Spectra of Derivatives of o-Hydroxybenzophenone. **CHEMICÉ ZVESTI**, v. 22, p. 508-513, 1968. Disponível em: < http://www.chempap.org/file_access.php?file=227a508.pdf >..

INFANTOZZI COSTA, V. A. **ANATOMIA HUMANA**. Ribeirão Preto: 2014. v25

Disponível em: < http://neurociencia.tripod.com/labs/lela/textos/APOSTILA_ANATOMIA_HUMANA.pdf >.

JANJUA, N. R. et al. Systemic Absorption of the Sunscreens Benzophenone-3, Octyl-Methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor After Whole-Body Topical Application and Reproductive Hormone Levels in Humans. **J Investig Dermatol**, v. 123, n. 1, p. 57-61, 07//print 2004. ISSN 0022-202X.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22725.x> >.

JANSEN, R. et al. Photoprotection: Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 6, p. 867.e1-867.e14, 12// 2013. ISSN 0190-9622.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962213008955> >.

JIANG, R. et al. Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. **Br J Clin Pharmacol**, v. 48, n. 4, p. 635-7, Oct 1999. ISSN 0306-5251 (Print)1365-2125 (Electronic).

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00056.x> >.

KEJLOVÁ, K. et al. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 7, p. 1298-1303, 10// 2007. ISSN 0887-2333.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233307001671> >.

KERDIVEL, G. et al. Estrogenic potency of benzophenone UV filters in breast cancer cells: proliferative and transcriptional activity substantiated by docking analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60567, 2013. ISSN 1932-6203.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060567> >.

KHDAIR, A. et al. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 2, p. 137-144, 1/25/ 2010. ISSN 0168-3659.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365909006208> >.

KHOZA, P.; ANTUNES, E.; NYOKONG, T. Synthesis and photophysicochemical properties of zinc phthalocyanine derivatized with benzothiazole or carbazole photosensitizers. **Polyhedron**, v. 61, n. 0, p. 119-125, 9/18/ 2013. ISSN 0277-5387. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538713004312> >.

_____. Photophysicochemical behavior of carbazole derivatized zinc phthalocyanine in the presence of ZnO microparticles and when embedded in electrospun fibers. **Dyes and Pigments**, v. 104, n. 0, p. 57-66, 5// 2014. ISSN 0143-7208. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720813004968> >.

KOCKLER, J. et al. Photostability of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 91-110, 3// 2012. ISSN 1389-5567. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389556711001043> >.

KODA, T. et al. Uterotrophic effects of benzophenone derivatives and a p-hydroxybenzoate used in ultraviolet screens. **Environmental Research**, v. 98, n. 1, p. 40-45, 5// 2005. ISSN 0013-9351.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935104001008> >.

LEWICKA, Z. A. et al. Photochemical behavior of nanoscale TiO₂ and ZnO sunscreen ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 263, n. 0, p. 24-33, 7/1/ 2013. ISSN 1010-6030.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603013001810> >.

LIANG, M. et al. New organic photosensitizers incorporating carbazole and dimethylarylamine moieties for dye-sensitized solar cells. **Renewable Energy**, v. 36, n. 10, p. 2711-2716, 10// 2011. ISSN 0960-1481.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148111001170> >.

LIEBSCH, M. et al. UV-induced effects. **Altern Lab Anim**, v. 33 Suppl 1, p. 131-46, Jul 2005. ISSN 0261-1929 (Print)0261-1929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LITVINOV, V. A. et al. SIMS investigation of the influence of ultraviolet irradiation on amino acids. **Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics**, v. 74, n. 2, p. 183-187, 2010/02/01 2010. ISSN 1062-8738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3103/S1062873810020188> >.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. Editora Cengage learning, 1280 p, 2004.

MCVEAN, M.; LIEBLER, D. C. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. **Mol Carcinog**, v. 24, n. 3, p. 169-76, Mar 1999. ISSN 0899-1987 (Print)0899-1987. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MENAA, F.; MENAA, A. Chapter 64 - Skin Photoprotection by Polyphenols in Animal Models and Humans. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R., et al (Ed.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. San Diego: Academic Press, 2014. p.831-838. ISBN 978-0-12-398456-2.

MEYER, T. A.; BEASLEY, D. G. Enhanced photostability of suncare compositions containing avobenzene, França, WO2009108653 A1, 2009, setembro,3.

MTURI, G. J.; MARTINCIGH, B. S. Photostability of the sunscreens agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 200, n. 2-3, p. 410-420, 12/15/ 2008. ISSN 1010-6030.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010603008003870> >.

NASH, J. F. Human Safety and Efficacy of Ultraviolet Filters and Sunscreen Products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 35-51, 1// 2006. ISSN 0733-8635. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863505001129> >.

NASH, J. F.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J. Ultraviolet A Radiation: Testing and Labeling for Sunscreen Products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 63-74, 1// 2006. ISSN 0733-8635.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863505001038> >.

NICHOLS, J.; KATIYAR, S. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010/03/01 2010. ISSN 0340-3696.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3> >.

OKEREKE, C. S.; ABDEL-RHAMAN, M. S.; FRIEDMAN, M. A. Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. **Toxicology Letters**, v. 73, n. 2, p. 113-122, 8// 1994. ISSN 0378-4274.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378427494901015> >.

OSIPOV, A. N. et al. The formation of DNA single-strand breaks and alkali-labile sites in human blood lymphocytes exposed to 365-nm UVA radiation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, n. 0, p. 34-40, 8// 2014. ISSN 0891-5849.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914001993> >.

OSTERWALDER, U.; HERZOG, Q. B. A Sunscreen's Labeled Sun Protection Factor May Overestimate Protection at Temperate Latitudes: A Human In Vivo Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 10, p. 2457 - 2462, 2010.

Disponível em: < <http://www.skin-care-forum.basf.com/en/artikel/home/sustainable-sun-protection-with-sunscreens-requires-the-right-technology-and-good-compliance/2012/12/06?id=0c6a77ff-2f4c-44cf-ae77-faae9214ed0f&mode=Detail> >.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a espectroscopia**. 4a Edição. Cenage learning, 2010.

PARIS, C. et al. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 178-184, 2009. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00414.x> >.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. F. L. **Purification of laboratory chemicals**. 3th. elsevier, 2014. 752 ISBN 978-1-85617-567-8.

Disponível em: < [http://www.pyrobin.com/files/purification%20of%20laboratory%20chemicals%206e%20\(elsevier,%202009\).pdf](http://www.pyrobin.com/files/purification%20of%20laboratory%20chemicals%206e%20(elsevier,%202009).pdf) >.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. Â. D. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. 2014.

Disponível em: < <http://www.readcube.com/articles/10.1590/S0100-40422007000400047?tab=summary> >.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1-2, p. 1-14, 4/29/ 2005. ISSN 0003-2670.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005001169> >.

SCHLUMPF, M. et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 113-122, 12/1/ 2004. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X04003713> >.

SCHMIDT, A. W.; REDDY, K. R.; KNOLKER, H. J. Occurrence, biogenesis, and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. **Chem Rev**, v. 112, n. 6, p. 3193-328, Jun 13 2012. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr200447s> >.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters Part 1. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 28, n. 3, p. 229-234, 6// 1995. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449507118L> >.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794-802, 2/15/ 2007. ISSN 0020-1693.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169306000259> >.

SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 464-469, 2010. ISSN 1474-905X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B9PP00174C> >.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed LTC, 2000.

SINGH, S.; KUMAR, S. Numerical study on triple layer skin tissue freezing using dual phase lag bio-heat model. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 86, n. 0, p. 12-20, 12// 2014. ISSN 1290-0729.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S129007291400177X> >.

STAHL, W.; SIES, H. Chapter 29 Protection against solar radiation — protective properties of antioxidants. In: PAOLO, U. G. (Ed.). **Comprehensive Series in Photosciences**: Elsevier, v. Volume 3, 2001. p.561-572. ISBN 1568-461X.

STRASSBURG, C. P. et al. Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. **Gut**, v. 50, n. 2, p. 259-65, Feb 2002. ISSN 0017-5749 (Print)1458-3288 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUPPAN, P. Invited review solvatochromic shifts: The influence of the medium on the energy of electronic states. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 293-330, 1// 1990. ISSN 1010-6030. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1010603090870213> >.

THIELE, J. J.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. **Mol Aspects Med**, v. 28, n. 5-6, p. 646-67, Oct-Dec 2007. ISSN 0098-2997 (Print)0098-2997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2007.06.001> >.

THORPE, G. H. G.; KRICKA, L. J. [29] Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. In: MARLENE A. DELUCA, W. D. M. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 133, 1986. p.331-353. ISBN 0076-6879.

TSEKHANSKII, R. S. Absorption spectra of benzophenone derivatives containing donor groups - Springer. **Journal of Applied Spectroscopy** v. 5, n. 3, p. 237-241, 1968. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00605834> >.

TZANOVA, T. et al. Synthesis and antioxidant potential of novel synthetic benzophenone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2724-2730, 6// 2009. ISSN 0223-5234.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523408004169> >.

TØNNESSEN, H. H. **PHOTOSTABILITY OF DRUGS AND DRUG FORMULATIONS Second Edition - 52.pdf**. Second. London, England: 2014.

Disponível em: < http://ajprd.com/download/books_pdf/52.pdf >.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, n. 2–3, p. 99-104, 11/15/ 2001. ISSN 1011-1344.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401002020> >.

WATANABE, T. et al. Palladium-catalyzed direct synthesis of carbazoles via one-pot N-arylation and oxidative biaryl coupling: synthesis and mechanistic study. **J Org Chem**, v. 74, n. 13, p. 4720-6, Jul 3 2009. ISSN 0022-3263.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jo9003376> >.

WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 231-243, 6// 2004. ISSN 0887-2333.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233303001838> >.

Anexo 1. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B1** (Benzofenona-3).

Anexo 2. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B2** (Triflato de Benzofenona-3).

Anexo 3. Espectro de massas de alta resolução (ESI) do composto **B2** (Triflato de benzofenona-3)

Anexo 4. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B3** (Carbonato de Benzofenona-3).

Anexo 5. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B4** (Benzofenona).

Anexo 6. Espectro de massas de alta resolução (ESI) do composto **B4** (Benzofenona).

Anexo 7. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B5** (Benzofenona-3 fenil amino)

Anexo 8. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B6** (Carbazol de Benzofenona-3 fenil amino).

Anexo 9. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **B7** (Aduto de benzofenona-3 com succinato de alfa-tocoferol).

Anexo 10. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **T1** (Alfa-tocoferol).

Anexo 11. Espectro de massas EI (CG/EM) do composto **T4** (Alfa-tocoferamina).

Peso molecular = 429.72134

Anexo 12. Espectro RMN de hidrogênio ^1H RMN (CDCl_3) do composto **T5** (Succinato de Alfa-tocoferol).