UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Sônia Aparecida Figueiredo

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Maria José Vieira Fonseca

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Sônia Aparecida Figueiredo

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Maria José Vieira Fonseca

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

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

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

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

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

1. Introdução

1.1. Efeitos da radiação solar sobre a pele

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

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

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

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

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

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

As membranas celulares também são alvo da ação da radiação UVB e de modo consequente, da atividade das EROs, acarretando com isso, em danos oxidativos denominados de peroxidação lipídica (HIDRATA, SATO, SANTOS, 2004). O processo de lipoperoxidação consiste em uma cascata de eventos bioquímicos gerando peróxidos lipídicos e derivados ($L^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$) que promovem alterações na permeabilidade das membranas, falência dos mecanismos de troca de metabólitos (perda da seletividade), alterações no DNA e até mesmo a morte celular (LIMA, ABDALLA, 2001; POLTE, TYRRELL, 2004). A desorganização na membrana celular também resulta na liberação de fosfolipídeos que atuam sinergicamente, contribuindo para o aumento da atividade da fosfolipase citosólica A_2 ($cPLA_2$) e da ciclooxigenase 2 (COX-2), ambas induzidas pela radiação UV, ocasionando na formação de leucotrienos e prostaglandinas (PG), com destaque para a prostaglandina E_2 (PGE_2), que contribui para a inflamação da pele (HALLIDAY, 2005; COSTA, 2015).

A incidência de radiação UVB sobre a pele também causa um processo inflamatório, em resposta a um dano tecidual ocorrido no local. Este processo engloba uma cascata de eventos que inicia-se com a vasodilação arteriolar que resulta em um aumento no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular com migração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) da circulação sanguínea para o tecido lesionado. A dilatação acontece devido a ação da PGE_2 associada ao óxido nítrico (NO - produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) expressada após exposição contínua à radiação UV) e em presença de histaminas. A migração leucocitária é decorrente da presença de substâncias quimiotáticas como por exemplo as quimiocinas no sítio inflamatório. Em seguida, ocorre a ativação de múltiplas vias de sinalização acionadas pela ação das EROs e de danos diretos provenientes de UVB. As vias quinase reguladora por sinal (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38MARK ativam a transcrição de fatores de ativação de proteína 1 (AP-1) e fator nuclear kappa beta (NFκ-β). Este processo induz a regulação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (factor de necrose tumoral alfa – TNF-α, interleucina 1 beta - IL-1β, fator de crescimento transformante beta - TGF-β e interferon gama – INF-γ), envolvidos na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse oxidativo e apoptose. A fase final consiste na restauração da saúde do tecido com a redução do recrutamento de granulócitos, a vasodilação e a reversão da permeabilidade vascular, além do processo de fagocitose das células mortas (KIM, HE, 2014; FIGUEIREDO et al., 2014; COSTA, 2015; DAMIANI, ULLRICH, 2016).

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

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

A calcineurina, uma fosfatase serina/treonina dependente de Ca^{2+}/calmodulina, é conhecida como controladora central da resposta imune por atuar na imunidade adquirida com a apresentação de antígenos à células T reguladoras (SMIT et al., 2008; MUSSON et al., 2011). Esta enzima está relacionada a ativação de células T, a sinalização transcricional, ao crescimento e desenvolvimento muscular, aos mecanismos de apoptose e de reparo do DNA, a saúde cardíaca e neuronal, a formação de ossos, além de atuarem em células β-pancreáticas e na pele (MUSSON, SMIT, 2011; LI, RAO, HOGAN, 2011; ZHAO et al., 2014).

A calcineurina (Cn) é um heterodímero dividido em subunidade catalítica ligada à calmodulina de 60 KDa, calcineurina A (CnA), e subunidade reguladora constituída de uma proteína de 19 KDa ligada ao Ca^{2+}, calcineurina B (CnB). A CnA possui um domínio catalítico N-terminal, um segmento helicoidal de ligação à CnB, um segmento de ligação à calmodulina e um peptídeo auto-inibitório, sendo que as três últimas regiões compõem a região reguladora da subunidade (Figura 1A) (YE et al., 2013; CEN et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

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

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

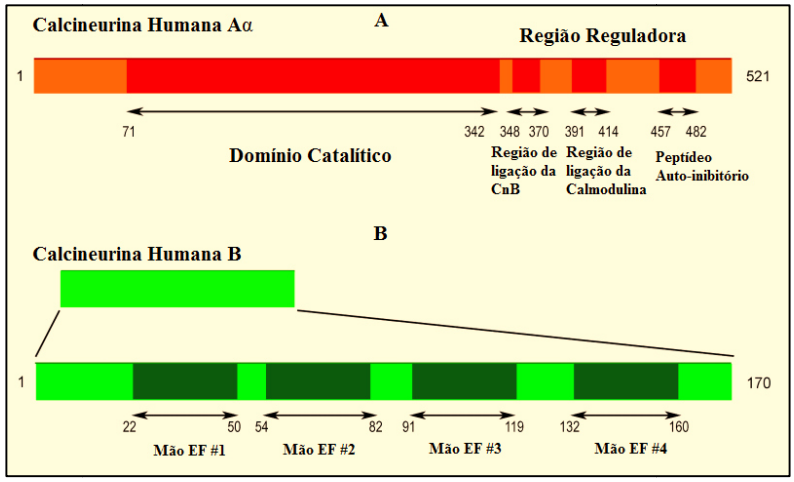

Figura 1 - Representação do domínio organizacional da enzima calcineurina, sendo (A): a subunidade catalítica (CnA) e (B): a subunidade reguladora (CnB). Retirado de Li, Rao, Hogan (2011).

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

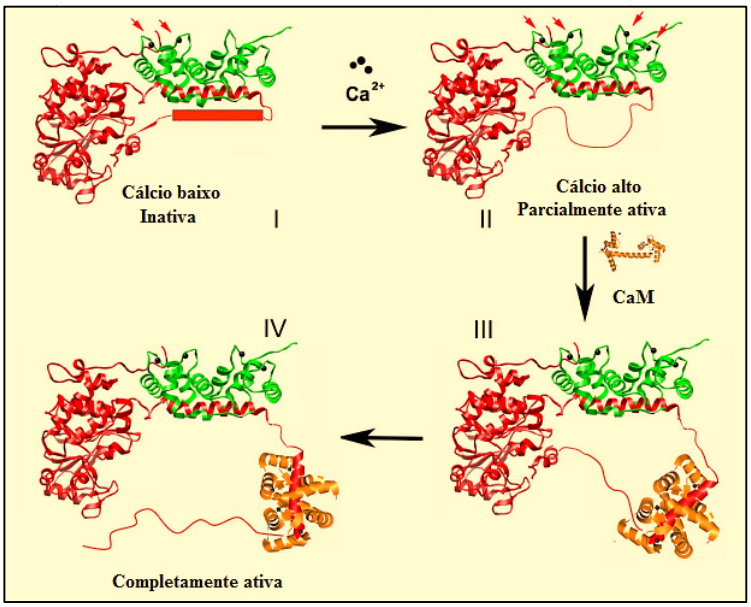

Figura 2 - Representação do mecanismo de ativação da enzima calcineurina. A etapa I consiste em baixa concentração de cálcio e na inativação da enzima. A ocupação de íons Ca^{2+} nos locais de baixa afinidade na subunidade CnB causa uma dissociação da região de ligação a calmodulina e possibilita a transição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

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

A sequência de eventos moleculares que culmina na transcrição de citocinas de ativação é apresentada na Figura 3. O processo inicia-se com a apresentação de um antígeno ao receptor de células T, localizado na membrana plasmática, ativando-a. A célula T ativada resulta na liberação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O IP3 promove a abertura dos canais de Ca^{2+} no retículo endoplasmático resultando no aumento da concentração intracelular com a liberação do estoque de Ca^{2+}, essencial para a ativação da calmodulina. O complexo Ca^{2+}/Calmodulina ativa a enzima calcineurina. Esta,

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

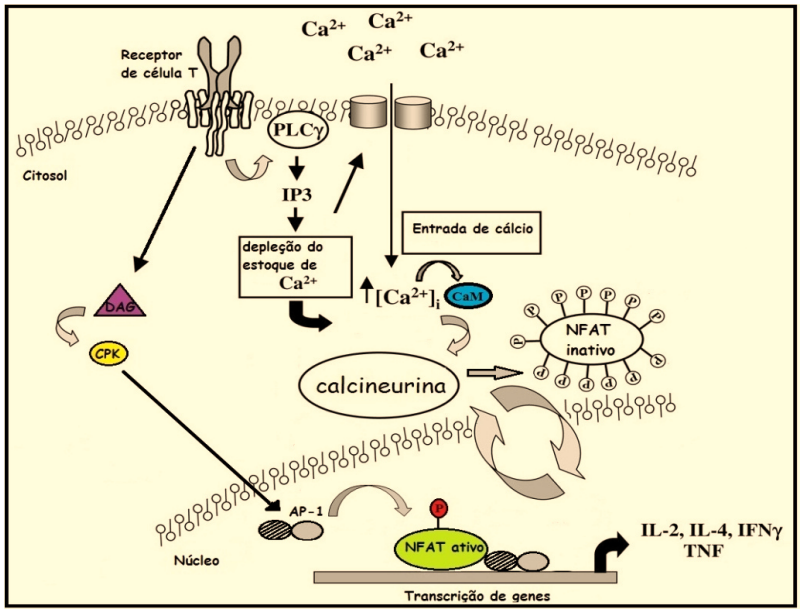

Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização da calcineurina. PLC-γ – fosfolipase C; IP3 – inositol 1,4,5-trifosfato; CaM – calmodulina; DAG – diacilglicerol; CPK – proteína quinase C; NFAT – fator nuclear de células T ativadas; AP-1 - Proteína ativadora 1; IL-2 – interleucina-2; IL-4 –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

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

contribuidores para o surgimento de tumores (MUSSON et al., 2011; SMIT et al., 2010; MUSSON, MULLENDERS, SMIT, 2012).

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

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

Os protetores solares são formulações de uso tópico, constituídas de filtros UV que precisam ser química e fotoquimicamente estáveis. Caso não sejam, sob ação da radiação solar, as suas ligações químicas podem ser rearranjadas levando a formação de novas moléculas, com menor poder de absorção da radiação UV, ou mesmo com absorção anulada, e suas propriedades toxicológicas podem ser alteradas, diminuindo a segurança destes produtos. Os protetores solares são constituídos de uma mistura de filtros orgânicos que absorvem as radiações UVA e UVB em todo o seu espectro e de filtros inorgânicos que atuam por reflexão, absorção e/ou dispersão da luz solar. Os filtros orgânicos são moléculas com estrutura aromática simples ou múltipla, comumente conjugadas com diferentes grupos químicos (carbonila, ligações duplas, etc). Os filtros inorgânicos são representados pelos óxidos, ZnO e TiO_2, e são apresentados na forma de nanopartículas ultrafinas ou micronizadas garantido a melhor dispersibilidade da RUV e maior transparência sobre a pele. O espalhamento e a absorção da radiação são determinados pelo índice de refração, pelo tamanho da partícula, pela dispersão na emulsão e pela espessura do filme que se forma na pele. Os filtros UV são compostos amplamente utilizados em produtos cosméticos como cremes faciais para o dia, produtos pós-barba, maquiagens, batons, xampus e em materiais de embalagens plásticas (SERPONE, DONDI, ALBINI, 2007; KOCKLER et al., 2012; MILLINGTON, OSMOND, McCALL, 2014; VELA-SORIA et al., 2014)

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

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

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

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

Zinc oxide**		25%	Não tem limite	25%
TOTAL DE FILTROS UV	**28**	**16**	**29**	**33**

INCI: International Nomenclature Cosmetic Ingredient
*Expresso como ácido
**Filtros físicos/inorgânicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusões

Diante dos resultados obtidos, as principais conclusões foram:

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

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

✓ As maiores alterações observadas em células de L929 corresponderam a viabilidade celular e a peroxidação lipídica, induzidas por 0,5 J/cm² e 30,0 J/cm² de radiação UVB, respectivamente.

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

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

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

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

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

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

✓ As condições ideais para medida da atividade de calcineurina foram padronizadas para o uso de 7,5 µM de substrato fosfopeptídeo RII *Ser*-fosforilado, temperatura de 30ºC, tempo

de reação de 30 minutos, diluição do homogeneizado de células HDFn para 1:2, adição dos ácidos inibitórios ocadaico e abscísico e adição de 2,5 mM de $CaCl_2$ no tampão ensaio 2x.

- ✓ O homogeneizado de células HDFn permitiu uma redução na atividade de calcineurina de forma linear com o aumento da radiação UVA-1.
- ✓ Os protetores solares da marca A, com menor quantidade de filtros UV que absorvem a fração UVA-1, não foram capazes de proteger o lisado de células HDFn da perda de atividade da calcineurina induzida pela radiação UVA-1.
- ✓ Os protetores solares da marca B, com os maiores valores de PPDs e com os filtros orgânicos específicos que absorvem a radiação UVA-1, foram capazes de proteger os lisados celulares da redução de atividade de calcineurina provocada pela fração UVA-1.
- ✓ Com estes resultados foi possível demonstrar que o ensaio de medida da atividade de calcineurina foi seletivo para avaliar produtos fotoprotetores ricos em filtros UVA-1.

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

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

7. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+}-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, 157 (1986) 375-380.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A.; CUNHA, T. M.; dos SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* and *in vivo*

photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 131 (2014) 65-73.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAMORE, S.; WONDRAK, G. T. UVA causes dual inactivation of cathepsin B and L underlying lysosomal dysfuntion in human dermal fibroblastos. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 123 (2013) 1-12.

LEBONVALLET, N.; JEANMAIRE, C.; DANOUX, L.; SIBILLE, P.; PAULY, G.; MISERY, L. The evalution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **European Journal of dermatology**, 20 (2010) 671-684.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MOYAL, D.; CHARDON, A.; KOLLIAS, N. Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point: (Part 1) Calibration of the method. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 16 (2000) 245–249.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VILBER LOURMAT. Informações sobre o sistema de irradiação UV, Bio-Spectra-3. 2014. Disponível em: <http://www.biosystems.com.br/produto/1703/sistemairradiacaouv3modosdeirrad312365nmptestesdesensibilizacao220volts >. Acesso em: 01 fev. 2016.

VILELA, F. M. P; FONSECA, Y. M.; JABOR, J. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; FONSECA, M. J. V. Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 80 (2012) 387-392.

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

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

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

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

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

ZHAO, Y.; YANG, H.; MENG, K.; YU, S. Probing the Ca^{2+}/CaM-induced secondary structural and conformational changes in calcineurin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 64 (2014) 453-457.

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

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