



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT)**

**Camila Martins Kawakami**

**Ribeirão Preto**

**2019**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientado(a):** Camila Martins Kawakami

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 12/12/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto**

**2020**

Kawakami, C.M.	Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT)	Espaço de <b>2,5 cm</b> reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO FCFRP-USP 2019
-------------------	--	--	--------------------------------

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

Kawakami, Camila Martins

Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT). Ribeirão Preto, 2019.

100 p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar

1. Fotoestabilidade.
2. Fototoxicidade.
3. Filtros solares.
4. Antioxidantes.
5. Quercetina.
6. Carreadores lipídicos nanoestruturados.
7. Pele humana reconstituída.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Camila Martins Kawakami

Título do trabalho: Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# Dedicatória

A **Deus**.

Aos meus amados pais **Cláudia** e **Kogi**.

*“Por serem exatamente quem são. Por me criarem exatamente como criaram. Por me darem toda a estrutura, tanta estrutura. Por fazerem com que eu possa sentir de tudo, tentar caminhos, voar para longe, sabendo que tenho, sempre tive e sempre terei suporte. Por me darem a chance rara, o quase luxo, de apenas viver. Porque todo o resto eles fizeram por mim”. Ruth Manus*

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

À minha querida avó **Dulce**, pelo amor, doçura e por estar sempre presente na minha vida.

A todos os meus **amigos** e **familiares** que torcem pelas minhas conquistas, me incentivam e me apoiam em todos os momentos.

Ao meu noivo **Felipe**, por estar sempre ao meu lado, por todo seu apoio, incentivo e paciência. Também à toda sua família, por todo apoio, torcida e conselhos.

## **Agradecimento especial**

À minha querida orientadora Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, por todos seus ensinamentos, pelas oportunidades de aprendizado, pelo crescimento pessoal e profissional e apoio em todas as horas. Muito obrigada!

# Agradecimentos

Às amigas de laboratório **Renata, Larissa, Carolina, Karen, Juliana, Marcela, Ana Júlia, Izadora, Clarissa, Thaís** e **Camila** pela amizade, apoio e incentivo.

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

Aos professores **Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato, Prof. Dr. Marlus Chorili** e **Dr. Alexandre Ferro Aissa**, pelas correções e sugestões feitas a esse trabalho durante o exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato** e a todo seu grupo de pesquisa pelo apoio e desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

À **Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira** e a toda sua equipe pelo apoio e orientação durante a realização do experimento do cometa.

À **Profa Dra. Monika Shäefer-Korting** e a toda sua equipe pela oportunidade de realização do estágio BEPE. Em especial ao **Dr. Christian Zoschke**, pela disponibilidade, apoio e por toda ajuda prestada durante a realização dos experimentos.

Ao professor **Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal**, por toda atenção e solicitude prestadas durante a disciplina de Fundamentos de Cromatografia.

À professora **Dra Silvyta Stuchi Maria-Engler**, pela atenção e parceria com o modelo de pele reconstituída.

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

À empresa **Allergisa**, que gentilmente aceitou realizar os estudos clínicos.



Aos técnicos **Patrícia, Juliana, Júnior, Perpétua, Taís, Klaus, Agnaldo e Carola** e a todos que de alguma forma, ajudaram na realização deste trabalho.

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

A todos os **professores** do Colégio Franciscano do Coração de Maria, da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que contribuíram para minha formação.

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

**Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro desta pesquisa, através do Processo nº 2015/10017-3 e 2018/10481-0.

Aos funcionários do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, em especial às médicas **Dra Maria de Fátima Galli Sorita Tazima e Dra Ana Laura Ferreira Marsico Dalto** por aceitarem participar da pesquisa.

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

*“Se eu vi mais longe, foi por estar de  
pé sobre ombros de gigantes”*

ISAAC NEWTON

## RESUMO

KAWAKAMI, C. M. **Avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT)**. 2019. 100f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Atualmente, sabe-se que a aplicação regular de filtros solares constitui umas das principais medidas na prevenção dos danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV). No entanto, o uso de associações fotoinstáveis pode reduzir a eficácia fotoprotetora e levar à formação de intermediários reativos, os quais podem apresentar potencial em causar fotoirritação, fotoalergia e fotogenotoxicidade na pele. Além disso, tem-se observado uma tendência na adição de substâncias antioxidantes aos filtros solares convencionais, a fim de prevenir os danos oxidativos mediados pelas espécies reativas do oxigênio (EROs), sendo que a quercetina (QT) é uma opção interessante. No entanto, sua limitada absorção cutânea pode levar à falta de eficácia como agente fotoprotetor, o que leva a necessidade da utilização de sistemas de liberação, a fim de melhorar sua penetração na pele. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) em cultura celular, em modelo de pele humana reconstituída e em humanos. Primeiramente, quatro formulações fotoprotetoras (F1, F2, F3 e F4), contendo diferentes associações dos filtros solares dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), metoxicinamato de etilexila (MTX), avobenzona (AVO) e bemotrizinol (BMTZ), foram submetidas aos estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade, geração de EROs (por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA), fototoxicidade em cultura de fibroblastos 3T3 e fotogenotoxicidade, por meio do ensaio do cometa. Uma vez que a associação A2 (contendo DHHB e MTX) apresentou melhores resultados quanto à fotoestabilidade e fotorreatividade em relação às associações A1 (contendo MTX, AVO) e A3 (contendo MTX, AVO e 3% BMTZ) ela foi associada aos CLN-QT e estudos posteriores foram realizados. Além disso, a associação A2 não aumentou os níveis de EROs intracelular após irradiação UVA e também não foi considerada fototóxica. No presente estudo foi observado que a inclusão de ensaios biológicos complementares ao estudo de fotoestabilidade forneceu informações mais relevantes e completas em relação ao ensaio de fotodegradação realizado de forma isolada para a seleção da associação mais adequada. Além disso, houve correlação entre a produção de EROs intracelular e fotorreatividade, portanto, sugerimos a inclusão desse ensaio na estratégia de avaliação da fotoestabilidade. Os resultados do estudo de avaliação da segurança e eficácia dos CLN-QT associados aos filtros solares demonstraram que os mesmos não apresentaram citotoxicidade em queratinócitos humanos primários e não foram considerados fototóxicos no modelo de pele humana reconstituída. Além disso, os CLN-QT associados aos filtros solares, apesar de não terem alterado o FPS (fator de proteção solar) em humanos (proteção contra eritema), reduziram significativamente a geração de EROs intracelular induzidos pela irradiação UVA (cerca de 30%) em relação aos filtros solares isolados e desta forma, complementaram a eficácia dos fotoprotetores

**Palavras-chave:** Fotoestabilidade, fototoxicidade, filtros solares, antioxidantes, quercetina, carreadores lipídicos nanoestruturados, pele humana reconstituída

## ABSTRACT

KAWAKAMI, C. M. **Safety and efficacy assessment of photoprotective formulations containing quercetin in nanostructured lipid carriers (CLN-QT)**. 2019. 100f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Nowadays it is well known that the regular application of UV filters is one of the main strategies in the prevention of damage induced by ultraviolet radiation (UV). However, the use of photounstable combinations can reduce photoprotective efficacy and lead to the formation of reactive intermediates, which may have potential to cause photoirritation, photoallergy and photogenotoxicity on the skin. In addition, there has been a tendency to combine antioxidants to conventional UV filters in order to prevent oxidative damage mediated by reactive oxygen species (ROS) and quercetin (QT) is an interesting option. However, its limited cutaneous absorption can lead to a lack of photoprotective efficacy, which leads to necessity of the use of delivery systems in order to improve its penetration into the skin. Therefore, this study aimed to evaluate safety and efficacy of photoprotective formulations containing quercetin in nanostructured lipid carriers (CLN-QT) in cell culture, reconstructed skin model and humans. Firstly, four photoprotective formulations (F1, F2, F3 and F4), containing different combinations of diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), ethylhexyl methoxycinnamate (MTX), avobenzene (AVO) and bemotrizinol (BMTZ) were submitted to the studies of photostability, photoreactivity, ROS generation (using DCFH<sub>2</sub>-DA probe), phototoxicity in 3T3 fibroblast culture and photogenotoxicity by comet assay. The combination C2 (containing DHHB and MTX) presented better results regarding photostability and photoreactivity when compared to combinations C1 (containing MTX and AVO) and C3 (containing MTX, AVO and 3% BMTZ), so it was combined to CLN-QT and subsequent studies were performed. Moreover, combination C2 did not increase intracellular ROS levels after UVA irradiation and it was not considered phototoxic. In the present study, it was observed that the inclusion of complementary biological assays to the photostability study provided more relevant results when compared to the photostability as a stand-alone assay for the selection of the best combination. In addition, it was demonstrated a good correlation between intracellular ROS production and photoreactivity, so we suggest the inclusion of intracellular ROS production in the photostability evaluation strategy. The safety and efficacy results demonstrated that UV filters + CLN-QT did not present cytotoxicity in primary human keratinocytes and were not considered phototoxic in reconstructed skin model. The CLN-QT + UV filters did not alter SPF (sun protection factor) in humans (protection against erythema), however they reduced intracellular ROS generation after UVA irradiation (about 30%), when compared to UV filters alone and thus complemented the efficacy of photoprotective formulations.

**Keywords:** Photostability, phototoxicity, UV filters, antioxidants, quercetin, nanostructured lipid carriers, reconstructed skin model

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	(A) Diagrama de <i>Jablonski</i> . S0: estado fundamental, S1: estado excitado singleto, T1: estado excitado tripleto, ISC: conversão intersistemas (B) Efeitos fotobiológicos causados por substâncias químicas.	11
<b>Figura 2-</b>	Estrutura molecular do metoxicinamato de etilexila	11
<b>Figura 3-</b>	Tautomerismo ceto-enólico sofrido pela avobenzona	12
<b>Figura 4-</b>	Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona	12
<b>Figura 5-</b>	Estrutura molecular do bemotrizinol	13
<b>Figura 6-</b>	Estrutura molecular do DHHB	14
<b>Figura 7-</b>	Estrutura molecular da quercetina	15
<b>Figura 8-</b>	Modelo de predição descrito no protocolo <i>ROS assay</i> , para a classificação de uma substância como não-fotorreativa, fracamente fotorreativa e fotorreativa	34
<b>Figura 9-</b>	Perfil cromatográfico dos filtros solares em solução de isopropanol (A) Picos: Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), Metoxicinamato de etilexila (MTX), Avobenzona (AVO) e Bemotrizinol (BMTZ) e da extração do veículo (formulação sem nenhum filtro solar) (B)	47
<b>Figura 10-</b>	Porcentagem de (A) DHHB, (B) metoxicinamato de etilexila (MTX), (C) avobenzona (AVO) e (D) bemotrizinol (BMTZ) nas formulações F1 (MTX e AVO, F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), após irradiação por UVA. Teste ANOVA, n=3 (média e intervalo de confiança 95%)	49
<b>Figura 11-</b>	Espectro de varredura das formulações em estudo: F1 (MTX e AVO, F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), quando submetidas ou não à irradiação UVA	51
<b>Figura 12-</b>	Porcentagens de absorção no UV (área sob a curva) das formulações F1 (MTX e AVO, F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), quando submetidas ou não à irradiação. Teste ANOVA, n=3 (média e intervalo de confiança 95%)	52

- Figura 13-** Geração de EROs intracelular pelos filtros solares DHHB, MTX, AVO e BMTZ, induzidos pela irradiação UVA ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM). 55
- Figura 14-** Geração de EROs intracelular pelas associações em estudo (A1, A2, A3 e A4), induzidos pela irradiação UVA ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM) 56
- Figura 15-** Curvas dose-resposta das associações em estudo classificadas como não fototóxicos (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.) 58
- Figura 16-** Efeito das diferentes doses de radiação UV sobre o DNA, observado pelo ensaio cometa, empregando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM) 59
- Figura 17-** Resultados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio de captação do vermelho neutro ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM) 60
- Figura 18-** Efeito da avobenzona sobre o DNA, observado pelo ensaio cometa, empregando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM) 61
- Figura 19-** Comparação do perfil de distribuição de diâmetro dos CLN-QT e CLN-QT + filtros solares. CLN-QT: carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina. Curva em verde: CLN-QT; Curva em vermelho: CLN-QT + filtros solares 63
- Figura 20-** Citotoxicidade das substâncias e combinações em estudo, utilizando queratinócitos humanos primários ( $n=5$ , média  $\pm$  SEM). Conc 1:  $750 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $375 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $3,75 \mu\text{g/mL}$  QT (quercetina). Conc 2:  $500 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $250 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $2,5 \mu\text{g/mL}$  QT. Conc 3:  $100 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $50 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $0,5 \mu\text{g/mL}$  QT. Conc 4:  $50 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $25 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $0,25 \mu\text{g/mL}$  QT. 63
- Figura 21-** (A) Geração de EROs intracelular pelos controles quercetina ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) e norfloxacin (100  $\mu\text{g/mL}$ ) após irradiação (B) Atividade antioxidante das substâncias em estudo, após irradiação UVA ( $5 \text{ J/cm}^2$ ), utilizando a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA ( $50 \mu\text{M}$ ) (Média e SEM,  $n=5$ ). Conc 1:  $750 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $375 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $3,75 \mu\text{g/mL}$  QT (quercetina). Conc 2:  $500 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $250 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $2,5 \mu\text{g/mL}$  QT. Conc 3:  $100 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $50 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $0,5 \mu\text{g/mL}$  QT. Conc 4:  $50 \mu\text{g/mL}$  MTX,  $25 \mu\text{g/mL}$  DHHB e  $0,25 \mu\text{g/mL}$  QT. 65

- Figura 22-** Curvas dose-resposta das associações em estudo classificadas como não fototóxicos (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.) 67
- Figura 23-** Análise histológica do modelo de pele reconstituída. (A) hematoxilina e eosina (HE) e (B) DAPI 68
- Figura 24-** Fototoxicidade das substâncias em estudo, após irradiação UVA ( $6 \text{ J/cm}^2$ ), utilizando modelo de pele reconstituída. NT: controle não tratado; Clorp: clorpromazina 0.02%; Filtros solares: MTX e DHHB; Filtros solares + CLN-QT: MTX, DHHB e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; (CLN-QT): carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; CLN-vazios: carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina; QT: quercetina; VE: veículo (óleo de gergelim) (Média e SEM, n=3) 69
- Figura 25-** Liberação de IL-6, após irradiação UVA ( $6 \text{ J/cm}^2$ ), utilizando modelo de pele reconstituída. NT: controle não tratado; Clorp: clorpromazina 0.02%; Filtros solares: MTX e DHHB; Filtros solares + CLN-QT: MTX, DHHB e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; (CLN-QT): carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; CLN-vazios: carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina; QT: quercetina; VE: veículo (óleo de gergelim) (Média e SEM, n=3) 70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Filtros solares aprovados no Brasil	9
<b>Tabela 2-</b>	Métodos alternativos reconhecidos no Brasil	19
<b>Tabela 3-</b>	Composição das formulações fotoprotetoras (% p/p)	30
<b>Tabela 4-</b>	Ingredientes ativos presentes nas formulações fotoprotetoras	40
<b>Tabela 5-</b>	Composição das formulações submetidas ao estudo de determinação do FPS	43
<b>Tabela 6-</b>	Precisão e exatidão intra e inter-ensaio. DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato; MTX: metoxicinamato de etilexila; AVO: avobenzona; BMTZ: bemotrizinol	48
<b>Tabela 7-</b>	Resultados obtidos no ensaio de fotoreatividade dos filtros solares isolados e das associações (n=2). C+: controle positivo, C-: controle negativo	54
<b>Tabela 8-</b>	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade dos filtros solares em estudo em cultura de fibroblastos (2 experimentos independentes em sextuplicata).	57
<b>Tabela 9-</b>	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo estudo (A1, A2, A3 e A4) em cultura de fibroblastos (2 experimentos independentes em sextuplicata).	57
<b>Tabela 10-</b>	Sensibilidade dos queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) à radiação UVA	59
<b>Tabela 11-</b>	Resumo dos resultados obtidos com as associações de filtros solares	62
<b>Tabela 12-</b>	Valores de diâmetro e índice de polidispersão (PdI) dos CLN-QT associados ou não aos filtros solares (CLN-QT + filtros solares). CLN-QT: carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina	62
<b>Tabela 13-</b>	Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo em cultura de fibroblastos (N=2)	66
<b>Tabela 14-</b>	Valores obtidos para o FPS <i>in vivo</i> das formulações em estudo (n=5). F1: filtros solares; F2: filtros solares + CLN-QT; F3: filtros solares + quercetina livre; F4: filtros solares + CLN-vazios (sem quercetina)	71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+UV	Irradiado
<sup>3</sup> AVO <sup>K</sup>	Avobenzona no estado excitado tripleto
3R's	<i>Refine, Reduction and Replacement</i>
3T3 NRU PU	Teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
6-4 PPs	<i>Fotoproducto (6-4)-pirimidina-pirimidona</i>
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxiguanina
A	Associação
ABTS	2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVO	Avobenzona
AVO <sup>E</sup>	Avobenzona na forma enólica
AVO <sup>K</sup>	Avobenzona na forma cetona
BHT	Butil- hidroxitolueno
BMTZ	Bemotrizinol
C+	Controle positivo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-QT	Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina
COLIPA	<i>The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CPD	Dímeros de ciclobutano pirimidinas
CV	Coefficiente de variação
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>

DCFH <sub>2</sub> -DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DEc	Efeito dose
DHHB	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC50	Concentração de uma substância que inibe 50% da viabilidade celular
EE	Eficiência de encapsulamento
EROs	Espécies reativas do oxigênio
F	Formulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FP-UVA	Fator de proteção UVA
GSH	Glutathiona
HaCaT	Queratinócitos humanos imortalizados
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCI	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
INN	<i>International Nonproprietary Names</i>
ISC	Conversão intersistemas
J	Joules
JaCVAM	<i>Japanese Center for the Calidation of Alternative Methods</i>
kJ	Kilojoules

MED	Dose mínima eritematosa
MMPs	Metaloproteinases
MPE	Mean photo effect
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5 difenil tetrazolio
MTX	Metoxicinamato de etilexila
mW	Miliwatts
NBT	Cloreto nitroazul de tetrazólio
ND	Não determinável
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NT	Não tratado
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
p/p	Peso/peso
p53	Proteína 53
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PdI	Índice de polispersão
PEci	Foto efeito
PIF	<i>Photo irritation factor</i>
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i>
QT	Quercetina
r	Coeficiente de correlação
Rc	Resposta
REc	Efeito resposta
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RNO	P-nitroso-N,N-dimetilanilina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	Rotações por minuto

S1	Estado excitado singleto
SA	Ânion superóxido
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SO	Estado fundamental eletrônico
SO	Oxigênio singleto
SPF	Sun protection factor
T1	Estado excitado tripleto
UV	Ultravioleta
-UV	Não irradiado
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
W	Watts

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$\epsilon$	Coefficiente de absorvidade molar
E	Isômero <i>trans</i>
Z	Isômero <i>cis</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singleto
•OH	Radical hidroxil
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
ROO•	Radical peroxil
RO•	Radical alcoxil
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1. A radiação solar e a pele .....	6
2.2. Fotoproteção .....	7
2.2.1. Filtros solares .....	7
2.2.2. Fotoquímica e fotoestabilidade dos filtros solares.....	19
2.2.3. Antioxidantes e quercetina.....	14
2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores .....	16
2.3.1. Avaliação da eficácia de fotoprotetores .....	16
2.3.2. Avaliação da segurança de fotoprotetores .....	17
2.3.2.1. Avaliação da fototoxicidade .....	19
2.3.2.2. Avaliação da genotoxicidade / fotogenotoxicidade .....	21
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo geral .....	25
3.2. Objetivos específicos .....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1. Materiais .....	27
4.1.1. Matérias-primas e reagentes .....	27
4.1.2. Equipamentos e acessórios .....	29
4.2. Métodos .....	30
<b>4.2.1. Desenvolvimento das formulações fotoprotetoras .....</b>	<b>30</b>
4.2.1.1. Elaboração das formulações .....	30
4.2.1.1.1. Testes preliminares de estabilidade .....	31

4.2.1.1.2. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores .....	31
4.2.1.1.2.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo .....	31
4.2.1.1.2.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares por CLAE ....	31
4.2.1.1.2.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV .....	32
4.2.1.2. Avaliação da fotorreatividade dos fotoprotetores .....	32
4.2.1.3. Avaliação da geração de EROs por meio da sonda DCFH <sub>2</sub> -DA .....	34
4.2.1.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT) .....	34
4.2.1.5. Ensaio do cometa utilizando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) .....	36
4.2.1.5.1. Padronização da dose de radiação UV .....	36
4.2.1.5.2. Determinação da fototoxicidade da avobenzona .....	37
4.2.1.5.3. Ensaio do cometa .....	37
4.2.1.5.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de tripan .....	38
<b>4.2.2. Avaliação da segurança e eficácia de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) associados a filtros solares .....</b>	<b>38</b>
4.2.2.1. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) .....	39
4.2.2.1.1. Caracterização dos CLN quanto ao diâmetro e potencial zeta .....	39
4.2.2.1.2. Avaliação da Eficiência de Encapsulamento .....	39
4.2.2.1.3. Preparo dos CLN-QT associados aos filtros solares .....	40
4.2.2.2. Avaliação da citotoxicidade utilizando MTT .....	40
4.2.2.3. Avaliação da atividade antioxidante por meio da sonda DCFH <sub>2</sub> -DA .....	41
4.2.2.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT) .....	41
4.2.2.5. Modelo de pele humana reconstituída .....	41
4.2.2.5.1. Construção do modelo de pele reconstituída .....	41
4.2.2.5.2. Avaliação da fototoxicidade em modelo de pele reconstituída .....	42
4.2.2.5.3. Quantificação da citocina inflamatória IL-6 .....	42
<b>4.2.3. Determinação do FPS <i>in vivo</i> das formulações contendo CLN-QT associados aos filtros solares .....</b>	<b>42</b>
4.2.4. Análise estatística .....	44
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Desenvolvimento das formulações fotoprotetoras .....</b>	<b>46</b>
5.1.1. Testes preliminares de estabilidade .....	46
5.1.1.1. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores .....	46

5.1.1.1.1. Desenvolvimento e padronização do método por CLAE .....	46
5.1.1.1.1.1. Linearidade .....	46
5.1.1.1.1.2. Seletividade.....	46
5.1.1.1.1.3. Precisão e exatidão.....	47
5.1.1.1.1.4. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores por CLAE .....	48
5.1.1.1.1.5. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV .....	50
5.1.2. Avaliação da fotorreatividade dos filtros solares e associações em estudo .....	52
5.1.3. Avaliação da geração de EROs por meio da sonda DCFH <sub>2</sub> -DA .....	54
5.1.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT).....	56
5.1.5. Ensaio do cometa utilizando queratinócitos humanos (HaCaT).....	58
5.1.5.1. Padronização das condições de irradiação .....	58
5.1.5.2. Determinação da fototoxicidade da avobenzona .....	60
5.1.5.3. Ensaio do cometa .....	60
<b>5.2. Avaliação da segurança e eficácia de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) associados a filtros solares.....</b>	<b>61</b>
5.2.1. Caracterização dos lotes de CLN-QT associados aos filtros solares .....	62
5.2.2. Avaliação da citotoxicidade utilizando o corante MTT.....	63
5.2.3. Avaliação da atividade antioxidante das associações em estudo, utilizando a sonda DCFH <sub>2</sub> -DA .....	64
5.2.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT).....	66
5.2.5. Modelo de pele humana reconstituída .....	68
5.2.5.1. Construção do modelo de pele reconstituída .....	68
5.2.5.2. Avaliação da fototoxicidade em modelo de pele reconstituída .....	68
5.2.5.3. Quantificação da citocina inflamatória IL-6.....	69
<b>5.3. Determinação do FPS <i>in vivo</i> das formulações contendo CLN-QT associados aos filtros solares .....</b>	<b>70</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>



# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, sabe-se que a exposição à radiação ultravioleta (UV) é responsável por causar diversos danos à pele, tais como eritema, fotoenvelhecimento, imunossupressão e câncer (JANSEN et al., 2013; YOUNG et al., 2017). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou-se para o ano de 2018, 6.260 novos casos de câncer de pele melanoma e 165.580 novos casos de não melanoma, o que corresponde cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2018).

As radiações responsáveis por causar tais danos à pele correspondem às radiações UVB e UVA. A radiação UVB devido ao seu menor comprimento de onda (290-320 nm) é altamente energética e capaz de penetrar nas camadas mais superficiais da pele. Por outro lado, a radiação UVA apresenta um maior comprimento de onda (320-400 nm) e é capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele (DUPONT et al., 2013; NARAYANAN et al., 2010). Dessa forma, enquanto a radiação UVB é responsável por causar danos mais superficiais, tais como eritema, queimaduras solares e danos diretos no DNA, a radiação UVA atinge a derme e pode causar imunossupressão, fotoenvelhecimento e danos indiretos no DNA por meio da formação de EROs (VIOUX-CHAGNOLEAU, et al, 2006).

Nesse sentido, os filtros solares desempenham um papel fundamental na proteção contra os danos causados pela radiação UV. Uma formulação fotoprotetora ideal deve proporcionar uma proteção uniforme frente às radiações UVB e UVA, propriedades sensoriais agradáveis, uma vez que irão influenciar a adesão do consumidor ao produto e fotoestabilidade (SOHN, 2016; JANSEN et al., 2013).

A fotodegradação dos filtros solares pode resultar na perda da eficácia fotoprotetora, por meio da diminuição da capacidade de absorver a radiação UV e também levar à formação fotoprodutos reativos e EROs, os quais podem resultar em fotoirritação, fotoalergia e fotogenotoxicidade na pele. Portanto, existe uma crescente preocupação acerca da fotoestabilidade dos filtros solares (NASH; TANNER, 2014; KOCKLER, 2012; CHATELAIN; GABARD, 2001; KARLSSON et al., 2009). Ensaios biológicos devem ser considerados testes complementares ao estudo de fotoestabilidade, uma vez que podem demonstrar a relevância da fotodegradação e se representam riscos à saúde do consumidor (NASH; TANNER, 2014; BENEVENUTO et al., 2015).

Dentre os filtros solares orgânicos mais utilizados mundialmente, pode-se citar o metoxicinamato de etilexila (MTX), que confere alta proteção UVB, no entanto, está sujeito a sofrer fotoisomerização *cis-trans*, que por sua vez pode resultar na redução da absorção UVB (SHAATH, 2010). Já a avobenzona (AVO) está entre as poucas moléculas disponíveis capazes de absorver a radiação UVA. No entanto, ela pode sofrer reações de tautomerização e

fragmentação quando exposta à radiação UV, o que pode resultar na perda de sua eficácia fotoprotetora e formação de fotoprodutos tóxicos, tais como arilglioxals e benzílicos (SHAATH, 2016; KARLSSON et al., 2009).

Nesse contexto, novas abordagens têm sido utilizadas a fim de melhorar a fotoestabilidade dos filtros solares e também desenvolver novos compostos considerados mais fotoestáveis e capazes de substituir a avobenzona (SHAATH, 2010). No caso dos fotoestabilizadores, eles podem agir por diversos mecanismos tais como, competição pela absorção de fótons, transferência de energia dos estados excitados e por meio da atividade antioxidante (SHAATH, 2016).

O bemotrizinol é um filtro solar que confere ampla proteção frente à radiação UV (entre 290 a 390 nm) e também ajuda a promover a fotoestabilização de alguns filtros solares, como a avobenzona (SHAATH, 2010; BENEVENUTO et al., 2015). Já o dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB) é um filtro solar que foi introduzido no mercado com o propósito de se tornar o sucessor da avobenzona, uma vez que possui alto desempenho na região UVA, no entanto apresenta elevada fotoestabilidade (LHIAUBET-VALLET et al., 2010; KOCKLER et al., 2012; PUGLIA et al., 2014).

Considerando que os filtros solares convencionais não são completamente eficientes em proteger a pele contra os danos da radiação UV e que muitos deles podem levar a geração de EROs após reações de fotodegradação, a adição de ingredientes naturais com propriedades antioxidantes é uma tendência crescente. Formulações fotoprotetoras constituídas de filtros solares e antioxidantes podem apresentar efeitos sinérgicos quando comparados ao uso desses componentes de forma isolada e, portanto, promover um aumento da eficácia fotoprotetora (KAWAKAMI; GASPARI, 2015; MATSUI, 2016).

Nesse sentido, o flavonóide quercetina (QT) representa uma alternativa interessante, uma vez que apresenta elevada atividade antioxidante, principalmente por meio de sua capacidade de sequestrar EROs, inibir a peroxidação lipídica, promover a quelação de íons metálicos e a modulação de antioxidantes endógenos (WANG et al., 2016; HATAHET et al., 2016; LESJAK et al., 2018). Além disso, estudos mostraram que a aplicação tópica da quercetina levou a diminuição dos danos oxidativos causados pela radiação UVB e também à redução de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (CASAGRANDE et al., 2006; VICENTINI et al., 2011).

No entanto, considerando sua limitada absorção cutânea, é importante que sejam utilizados sistemas de liberação a fim de aumentar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, garantir sua eficácia fotoprotetora (VICENTINI et al., 2008; HATAHET et al., 2018; PIVETTA

et al., 2019). Vicentini et al. (2008) demonstraram que a quercetina incorporada em microemulsão aumentou a penetração cutânea *in vitro* em cerca de 20 vezes e inibiu a depleção do antioxidante endógeno glutathiona (GSH). Outro estudo mostrou que carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) promoveram um aumento da retenção da quercetina na derme e epiderme e melhoraram a atividade antioxidante e anti-inflamatória dessa substância (CHEN-YU et al., 2012).

Nosso grupo de pesquisa tem trazido contribuições na área de fotoproteção, uma vez que avaliamos a fotoestabilidade de filtros solares, bem como a influência da fotoestabilidade na eficácia de fotoprotetores e antioxidantes (KAWAKAMI; GASPAR, 2015; KAWAKAMI et al., 2017; FREITAS et al., 2015). No entanto, pela primeira vez, iremos demonstrar um estudo detalhado envolvendo o efeito da fotoestabilidade de filtros solares na fotorreatividade, produção de EROs intracelular e fotogenotoxicidade.

Os órgãos regulatórios preconizam a determinação do fator de proteção solar *in vivo* (FPS) e o fator de proteção UVA (FP-UVA) durante o processo de desenvolvimento de fotoprotetores (BRASIL, 2012a). No entanto, apesar de adequados, esses parâmetros são baseados na avaliação de sinais clínicos, tais como eritema e pigmentação cutânea. Desta forma, eles não levam em consideração as lesões causadas em níveis celulares por EROs e produtos de fotodegradação, os quais podem conduzir a sensibilização cutânea, dermatites de contato alérgica, fotoirritação e fotogenotoxicidade (SCHUCH et al., 2013; 2014; ONOUE et al., 2017).

No presente estudo, foram desenvolvidas formulações fotoprotetoras contendo diferentes associações de filtros solares e em seguida, as mesmas foram submetidas aos estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade, fototoxicidade, avaliação de EROs intracelular e fotogenotoxicidade. Posteriormente, a formulação fotoprotetora considerada mais promissora foi adicionada de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) e sua eficácia e segurança foi avaliada em cultura de células em monocamadas, pele humana reconstituída e em humanos.

Os resultados desse trabalho serão fonte de informação quanto à segurança e à eficácia das formulações fotoprotetoras e fornecerão, ainda, informações mais completas quando comparadas aos atuais estudos preconizados por agências regulatórias, os quais são apenas baseados na avaliação visual do eritema e da pigmentação cutânea.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1. A radiação solar e a pele

A luz solar é um espectro contínuo de radiação eletromagnética que compreende principalmente os espectros do ultravioleta (UV), visível e infravermelho. A radiação UV representa um pequeno componente do espectro eletromagnético, cerca de 5%, e pode ser subdividida em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm) (NARAYANAN et al., 2010).

A radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio na atmosfera, e, portanto, não apresenta relevância clínica. Já as radiações UVB e UVA correspondem cerca de 5% e 95%, da radiação UV que atinge a Terra, respectivamente (SCHUCH et al., 2017). Ambos os tipos de radiações apresentam efeitos benéficos sobre a saúde humana, como produção de vitamina D, liberação de óxido nítrico e melhora da imunidade inata. No entanto, a exposição aguda e crônica à radiação UV também é responsável por provocar inúmeros danos biológicos à pele (YOUNG et al., 2017).

A radiação UVB é altamente energética e capaz de penetrar nas camadas mais superficiais da pele (NARAYANAN et al., 2010; NICHOLS; KATIYAR, 2010). Este tipo de radiação está relacionado à formação de eritema, queimaduras solares e câncer de pele. Já a radiação UVA apresenta um maior comprimento de onda e alto poder de penetração na pele e está geralmente associada ao fotoenvelhecimento, bronzeamento, imunossupressão e também ao câncer de pele (DUPONT et al., 2013).

O câncer de pele é dividido em câncer do tipo melanoma e do tipo não-melanoma, sendo este subdividido em basocelular e espinocelular. Estima-se que os carcinomas basocelular e espinocelular sejam responsáveis por cerca de 95% dos cânceres de pele e que o melanoma compreenda apenas 5%, no entanto, é o que apresenta a maior taxa de mortalidade. Além disso, de acordo com a *Skin Cancer Foundation*, 90% dos cânceres de pele do tipo não-melanoma e 86% dos cânceres de pele do tipo melanoma estão relacionados à exposição solar (YEAGER; LIM, 2019).

A exposição cumulativa à radiação UV tem sido associada ao desenvolvimento de queratoses actínicas pré-cancerosas e carcinoma espinocelular. Já o carcinoma basocelular está associado à exposição intensas e intermitentes ao longo da vida. O desenvolvimento do câncer de pele tipo melanoma também está associado a exposições solares intensas e intermitentes que ocorreram principalmente durante a infância (JANSEN et al., 2013; YOUNG et al., 2017; HIBLER et al., 2016).

Os efeitos genotóxicos da radiação UVB estão relacionados à sua capacidade de provocar lesões diretas na molécula de DNA, sendo que dois tipos de lesões são

majoritariamente formados: dímeros de ciclobutano pirimidinas (CPDs) e o fotoproducto (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4 PPs) (MITCHELL et al., 2003; GARINIS et al., 2006; ASAHINA et al., 1999; PINNELL; DURHAM, 2003, SCHUCH et al., 2017). Já genotoxicidade da radiação UVA compreende mecanismos indiretos que envolvem a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), por meio da excitação de cromóforos da pele (MARROT; MEUNIER, 2008). Essas EROs podem reagir com a base guanina do DNA, gerando diversas lesões, tais como a 7,8-dihidro-8-oxiguanina (8-oxoG) (SCHUCH et al., 2017).

O gene supressor de tumor p53 apresenta fundamental importância em proteger a integridade do genoma celular, por meio da regulação do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. A irradiação de células de mamíferos pela luz solar resultou em um aumento na expressão da proteína p53 no núcleo, tornando-a, portanto, um marcador relevante para se avaliar a intensidade do estresse genotóxico (MARROT et al., 2004; WEBER et al., 2005). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que mutações na proteína p53 podem ser encontradas em pele com dano solar crônico, bem como em queratoses actínicas, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (MARROT; MEUNIER, 2008, CHEN et al., 2012).

A exposição à radiação UV pode provocar alterações morfológicas e funcionais nas células de *Langerhans* e também levar a alteração do perfil das citocinas presentes na pele, tais como IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  (JANSEN et al., 2013, SCHUCH et al., 2017).

A exposição crônica à radiação UV também apresenta um papel crítico no processo de envelhecimento cutâneo, sendo que o principal mecanismo consiste na indução de metaloproteinases (MMPs). As MMPs compreendem uma família de enzimas (endopeptidases) secretadas pelos queratinócitos e fibroblastos que são capazes de degradar o colágeno e as principais proteínas estruturais que compõem o tecido conjuntivo da derme, sendo que as MMP-1 (colagenase-1), MMP-3 (estromelisin-1) e MMP-9 (gelatinase-B) são as principais responsáveis por esse processo de degradação (PINNELL; DURHAM, 2003; JEAN et al., 2011).

## **2.2. Fotoproteção**

### **2.2.1. Filtros solares**

Os filtros solares desempenham um papel fundamental na proteção contra os danos causados pela radiação UV. O primeiro fotoprotetor comercial surgiu em 1928, nos Estados Unidos, e continha salicilato de benzila e cinamato de benzila em sua composição. O ácido para-aminobenzoico (PABA), um filtro solar UVB, foi patenteado em 1943, e tornou-se um

dos primeiros ingredientes ativos a serem amplamente utilizados em fotoprotetores comerciais. Somente nas décadas de 70 e 80 que os primeiros filtros solares UVA se tornaram disponíveis no mercado, sendo que a benzofenona-3 foi a pioneira (SAMBANDAN; RATNER, 2011; DUPONT et al., 2013; JANSEN et al., 2013).

No Brasil, Europa e Japão os filtros solares são classificados como cosméticos, nos Estados Unidos, como medicamentos livres de prescrição (“*over the counter*”) e na Austrália, como bens terapêuticos (“*therapeutic goods*”). Atualmente, existem cerca de 55 moléculas aprovadas mundialmente, sendo que a legislação brasileira permite a utilização de 34 filtros solares (Tabela 1) (BRASIL, 2016a; JANSEN et al., 2013).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), protetor solar é “qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVA e UVB, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação” (BRASIL, 2012a).

Os filtros solares podem ser classificados em inorgânicos (físicos) e orgânicos (químicos), sendo que existem apenas duas partículas inorgânicas aprovadas no mercado: óxido de zinco e dióxido de titânio. Ambos os ingredientes são considerados de amplo espectro, uma vez que eles absorvem e refletem os raios UVB e UVA, dependendo do tamanho das partículas (SHAATH, 2016; JANSEN et al., 2013).

Já os filtros solares orgânicos têm a capacidade de absorver as radiações UVB e UVA. Atualmente, essas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos, cujos substituintes têm grande importância no espectro de absorção da molécula (JANSEN et al., 2013; OSTERWALDER et al., 2014).

Os filtros orgânicos podem ser divididos em diferentes classes, de acordo com a sua estrutura química, tais como aminobenzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, derivados de cânfora, derivados de triazina, benzotriazóis, cianoacrilatos e dibenzoilmetanos.



**Tabela 1-** Filtros solares aprovados no Brasil

<b>Substância (NOME INCI)</b>	<b>Absorção</b>	<b>Máxima concentração autorizada</b>
Camphor benzalkonium methosulfate	UVB	6%
Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	UVA	10% (expresso como ácido)
Butyl methoxy dibenzoyl methane (avobenzona)	UVA	5%
Benzylidene Camphor Sulfonic Acid	UVB	6% (expresso como ácido)
Octocrylene	UVB	10% (expresso como ácido)
Cinoxate	UVB	3%
Menthyl anthranilate	UVB	5%
Triethanolamine salicylate	UVB	12%
Phenylbenzimidazole Sulfonic acid	UVB	8% (expresso como ácido)
Ethylhexyl methoxycinnamate	UVB	10%
Benzophenone-3	UVA/UVB	10%
Benzophenone-4	UVA/UVB	10% (expresso como ácido)
Benzophenone-5	UVA/UVB	5% (expresso como ácido)
Benzophenone-8	UVA/UVB	3%
4-Aminobenzoic acid (PABA)	UVB	15%
Homosalate	UVB	15%
Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	UVB	6%
Titanium Dioxide	UVA/UVB	25%
PEG-25 PABA	UVB	10%
Ethylhexyl dimethyl PABA	UVB	8%
Ethylhexyl salicylate	UVB	5%
Isoamyl p-methoxycinnamate	UVB	10%
4-methylbenzylidene camphor	UVB	4%
3-Benzylidene camphor	UVB	2%
Ethylhexyl Triazone	UVB	5%
Zinc Oxide	UVA/UVB	25%
Drometrizole trisiloxane	UVA/UVB	15%
Diethylhexyl butamido triazone	UVB	10%
Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	UVA/UVB	10%
Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	UVA	10% (expresso como ácido)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (bemotrizinol)	UVA	10%
Polysilicone-15	UVB	10%
Diethylamino hydroxybenzoyl hexil benzoate (DHHB)	UVA	10%
Tris-Biphenyl Triazine	UVA/UVB	10%

Fonte: Brasil (2016)

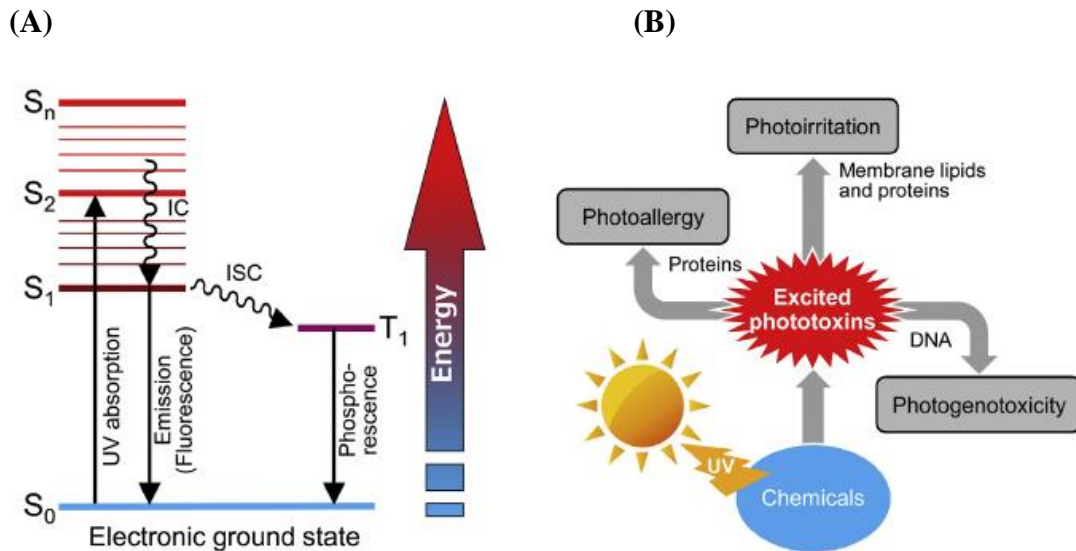
### 2.2.2. Fotoquímica e fotoestabilidade dos filtros solares

A fotoestabilidade dos filtros solares está relacionada à capacidade desses compostos de não sofrerem modificações estruturais durante o período de exposição à radiação UV. No entanto, grande parte dos compostos utilizados como filtros solares está sujeita a reações de fotodegradação, as quais podem levar à perda da capacidade absorviva e a geração de produtos tóxicos ou alérgicos na pele (KOCKLER et al., 2012). Romanhole et al (2016) demonstraram que dentre quatro formulações fotoprotetoras comerciais analisadas, três foram consideradas fotoinstáveis, uma vez que sofreram mudanças significativas em seus espectros de absorção após irradiação UV.

As reações de fotodegradação têm início quando, após a absorção de um fóton, os elétrons da molécula do filtro solar são promovidos do estado fundamental eletrônico (S0) para um estado excitado de maior energia, denominado estado excitado singleto (S1). A molécula excitada pode sofrer a conversão intersistemas (ISC) e atingir um estado de menor energia, conhecido como estado excitado tripleto (T1). A energia absorvida pode ser dissipada por diversas vias, tais como, conversão interna, fluorescência (no caso do estado excitado singleto), fosforescência (no caso do estado excitado tripleto) ou sofrendo reações químicas, as quais podem dar origem a fotoprodutos e /ou intermediários que são potencialmente reativos com outras moléculas (ONOUÉ et al., 2017) (Figura 1A).

A molécula do filtro solar no estado excitado tripleto pode reagir, posteriormente, por meio de duas vias principais: transferência de energia para o oxigênio molecular (reação fotoquímica tipo II), levando à formação do oxigênio singleto e transferência de elétrons ou hidrogênio (reação fotoquímica tipo I), levando à formação de radicais livres. Além disso, existe também a formação de produtos tóxicos. Estas reações fotoquímicas podem resultar em (a) fotoirritação através de danos oxidativos em lipídios e proteínas celulares, (b) fotogenotoxicidade através de danos no DNA e (c) fotoalergia através da ligação com proteínas na pele e posterior resposta dependente do sistema imunológico (SPIELMANN et al., 2000; ONOUÉ et al., 2017) (Figura 1B).

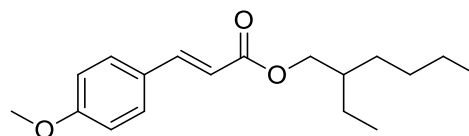
**Figura 1-** (A) Diagrama de Jablonski. S<sub>0</sub>: estado fundamental, S<sub>1</sub>: estado excitado singlete, T<sub>1</sub>: estado excitado tripleto, ISC: conversão intersistemas (B) Efeitos fotobiológicos causados por substâncias químicas.



Fonte: Onoue et al. (2017)

O metoxicinamato de etilexila é um filtro solar da classe dos cinamatos, sendo o mais utilizado no mundo. Esse composto está sujeito a sofrer fotoisomerização *cis-trans* (*cis*-isômero Z; *trans*- isômero E), de forma que o isômero E, predominante, apresenta um  $\lambda_{\text{máx}}$  de 310 nm, com um coeficiente de absorvidade molar elevado, de  $19.500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Já o isômero Z, formado após exposição à radiação UV, apresenta coeficiente de absorvidade molar bem inferior, de  $10.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , o que leva à redução da absorção UVB (SHAATH, 2010) (Figura 2).

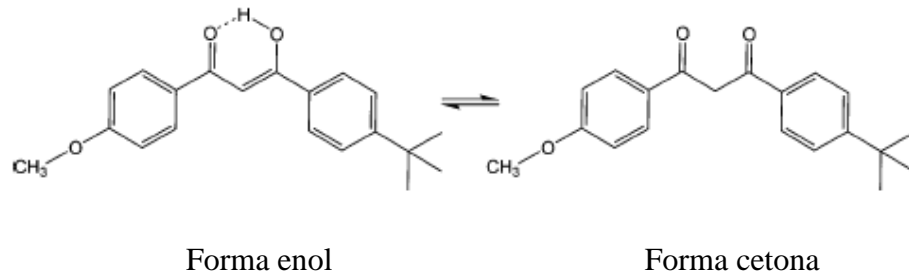
**Figura 2-** Estrutura molecular do metoxicinamato de etilexila



A avobenzona está entre os filtros solares UVA mais utilizados mundialmente, entretanto, apresenta fotoinstabilidade. O mecanismo de fotodegradação da avobenzona está associado à sua capacidade de sofrer tautomerismo ceto-enólico ( $\text{AVO}^{\text{E}}$  -  $\text{AVO}^{\text{K}}$ ). Após irradiação, a forma enol ( $\text{AVO}^{\text{E}}$ ), que apresenta alta absorção na região do UVA, é convertida

na forma cetona ( $\text{AVO}^{\text{K}}$ ), cuja absorção se dá na região do UVC, resultando na perda de sua eficácia fotoprotetora (SHAATH, 2010) (Figura 3).

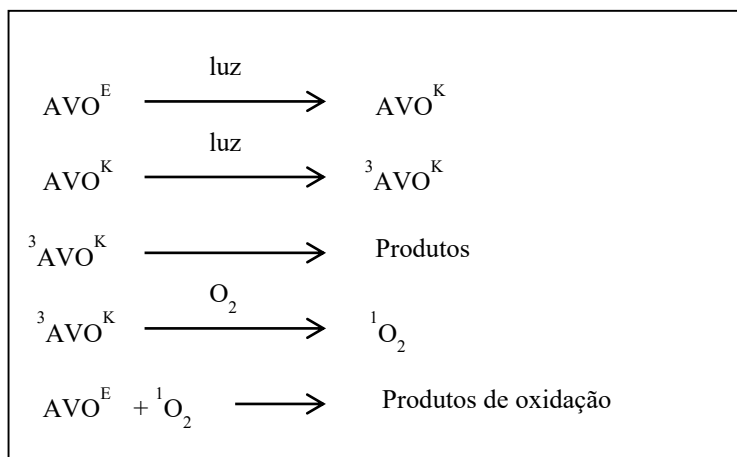
**Figura 3-** Tautomerismo cetó-enólico sofrido pela avobenzona.



Fonte: Shaath (2010)

A forma cetona pode, ainda, absorver fótons e atingir o estado excitado tripleto ( $^3\text{AVO}^{\text{K}}$ ), o qual é o principal responsável pelos efeitos prejudiciais da avobenzona. Nesse estado excitado pode haver formação de fotoprodutos. Além disso, pode ocorrer transferência de energia para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), o que acarreta na formação do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que por sua vez pode reagir com a forma enol ( $\text{AVO}^{\text{E}}$ ) e levar a formação de produtos de oxidação (LHIAUBEUT-VALLET, 2010; KOCKLER et al., 2012; SHAATH, 2010) (Figura 4).

**Figura 4-** Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona



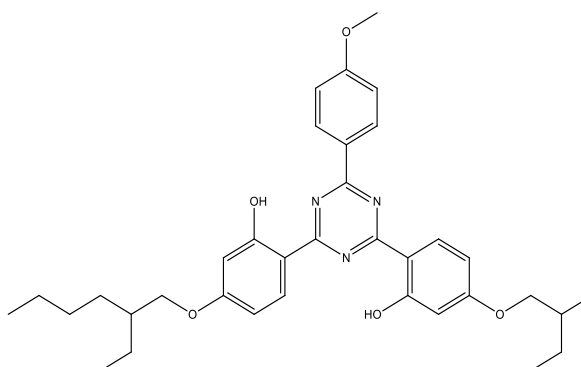
Fonte: Adaptado de Kockler et al. (2012).

Estudos demonstraram o potencial fototóxico e fotoalergênico da avobenzona, os quais podem estar relacionados aos fotoprodutos formados após exposição à radiação UV (GASPAR et al., 2013; GALBIATI et al., 2013; NASH; TANNER, 2014; ONOUE et al., 2017). Karlsson et al., 2009 demonstraram que a fotoinstabilidade da avobenzona leva à geração de vários produtos de fotodegradação, como benzílicos e arilglioxais, os quais foram considerados, respectivamente, citotóxicos e fortes sensibilizantes de acordo com ensaio do linfonodo local murino (LLNA).

Nesse contexto, novas abordagens vêm sendo utilizadas a fim de melhorar a fotoestabilidade dos filtros solares, como da avobenzona. Essas abordagens incluem principalmente, a utilização de moléculas denominadas fotoestabilizadoras, que possuem a capacidade de reduzir a fotodegradação dos filtros solares, por meio da neutralização dos estados excitados da molécula (denominados *quenchers*) e neutralização de EROs, através de sua atividade antioxidante. Dentre os fotoestabilizadores disponíveis no mercado podemos citar o octocrileno, etilhexilmetoxicrileno (EHMCR), tris-bifenil triazina, bisoctrizol, bemotrizinol, dentre outros (SHAATH, 2010; BONDA, 2010).

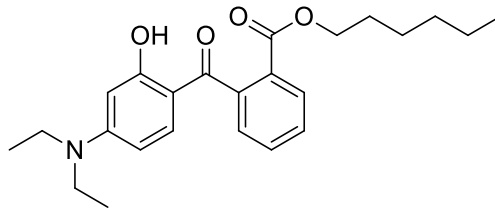
No caso do bemotrizinol, além de atuar como fotoestabilizador também é considerado um filtro solar de amplo espectro, uma vez que apresenta absorção na faixa entre 290 e 390 nm. Esse filtro solar apresenta alto peso molecular (> 500 Daltons), cuja vantagem é a diminuição de sua penetração na pele (SHAATH, 2010; BENEVENUTO et al., 2015) (Figura 5).

**Figura 5-** Estrutura molecular do bemotrizinol



Outra estratégia é o desenvolvimento de novas moléculas fotoestáveis capazes de substituir o uso da avobenzona. Nesse sentido, o filtro solar DHHB é uma boa opção, uma vez que apresenta alta absorção na região do UVA, com espectro muito semelhante à avobenzona, no entanto apresenta elevada fotoestabilidade (KAWAKAMI et al., 2017) (Figura 6).

**Figura 6-** Estrutura molecular do DHHB



### 2.2.3. Antioxidantes e quercetina

Os radicais livres constituem átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) e incluem os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ), hidroxil ( $\bullet OH$ ). O oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são considerados EROs, mas não são radicais livres, uma vez que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada eletrônica (LOBO et al., 2010).

Essas moléculas são produzidas continuamente durante processos metabólicos, tais como, geração de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas. Podem também ser produzidos em decorrência de processos inflamatórios, disfunções biológicas e exposição a agressões ambientais, como a radiação UV (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

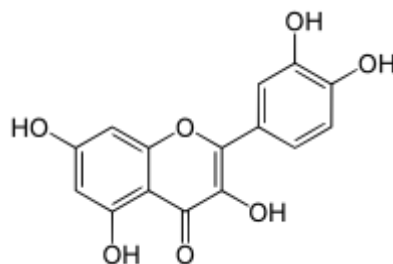
Nosso organismo dispõe de um eficiente sistema de defesa antioxidante, capaz de manter os níveis de EROs controlados. No entanto, o desequilíbrio entre a geração de EROs e a sua remoção pelo sistema antioxidante endógeno pode levar ao estresse oxidativo, que se caracteriza pela oxidação das biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático. O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes e câncer (BARBOSA et al., 2010; LUSHCHAK, 2014).

Uma vez que a exposição à radiação UV pode levar a um aumento da geração de EROs, substâncias antioxidantes, tais como os polifenóis, vem sendo utilizadas na prevenção de danos oxidativos mediados por eles (AFAQ, 2011). De forma geral, os antioxidantes protegem a pele das EROs por meio da (I) interceptação de espécies pró-oxidantes iniciais; (II) sequestro de metais pesados, impedindo as etapas de iniciação e propagação das reações de produzem as EROs; (III) interceptação de EROs secundárias, as quais podem propagar a reação em cadeia

ou reduzir grupos oxidados; (IV) reparo de macromoléculas e renovação celular (TEDESCO, 1997).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroflavona) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonols, amplamente encontrado em frutas e vegetais. Esse composto apresenta diversas propriedades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica (LESJAK et al., 2018; PIVETTA et al., 2019) (Figura 7). As propriedades antioxidantes da quercetina devem-se principalmente à sua capacidade de sequestrar EROs, inibir a peroxidação lipídica, promover a quelação de íons metálicos e a modulação de antioxidantes endógenos, tais como catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase (WANG et al., 2016; HATAHET et al., 2016).

**Figura 7-** Estrutura molecular da quercetina



Segundo Lee e Park (2019) a quercetina apresentou efeitos protetores contra danos na membrana celular induzidos por oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e elevada capacidade de sequestrar EROs, tais como radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio. Outros estudos demonstraram que camundongos tratados com quercetina tiveram melhora dos sintomas relacionados a dermatite atópica e redução da expressão de citocinas inflamatórias, tais como IL-4 e IL-5 (KARUPPAGOUNDER et al., 2016; ROGERIO et al., 2010).

Além disso, foi demonstrado que o tratamento com quercetina inibiu a produção das citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em queratinócitos humanos primários, submetidos à radiação UVB (VICENTINI et al., 2008). Em outro estudo também foi demonstrado os benefícios da aplicação tópica da quercetina na diminuição dos danos oxidativos causados pela radiação UVB (CASAGRANDE et al., 2006).

No entanto, a limitada absorção cutânea de quercetina, devido à sua baixa solubilidade em água, pode levar à falta de eficácia como agente fotoprotetor tópico (VICENTINI et al., 2008). Portanto, esforços significativos vêm sendo feitos no desenvolvimento de sistemas de

liberação, tais como nanocápsulas, microemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), a fim de melhorar sua penetração na pele (VICENTINI et al., 2008; NAGULA; WAIRKAR, 2019).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são as mais promissoras dentre os carreadores coloidais, uma vez que apresentam alta estabilidade, alta capacidade de encapsulamento, alta capacidade de carrear fármacos lipofílicos com controle de sua liberação, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis (PIVETTA et al., 2019; MARCATO, 2009). As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizadas por tensoativos. Os lipídios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras (MARCATO, 2009).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) fazem parte da segunda geração das NLS e apresentam em sua composição, lipídios sólidos e líquidos, a fim de reduzir a rigidez e a estrutura ordenada da matriz lipídica. Eles foram desenvolvidos com a intenção de melhorar o encapsulamento e minimizar a expulsão do fármaco das partículas durante o armazenamento, o que, em geral, ocorria com as NLS (NASERI et al., 2015; GARCÊS et al., 2018; PIVETTA et al., 2019).

Pivetta et al (2019) demonstraram que o encapsulamento da quercetina em carreadores lipídicos nanoestruturados (CL-QT) melhorou a sua penetração cutânea, em relação a seu uso livre. Outro estudo demonstrou que CLN-QT promoveu um aumento da retenção da quercetina na derme e epiderme e melhorou a atividade antioxidante e anti-inflamatória dessa substância (CHEN-YU et al., 2012).

## **2.3. Avaliação da performance de fotoprotetores**

### **2.3.1. Avaliação da eficácia de fotoprotetores**

O fator de proteção solar (FPS) e a proteção UVA (FPUVA) são dois índices comuns utilizados para quantificar a eficácia fotoprotetora. O FPS é o valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida. A dose mínima eritematosa corresponde a menor dose de radiação UVB capaz de produzir eritema na pele, com bordas claramente definidas, entre 16 e 24 horas após exposição aos raios UVB (FOURTANIER et al., 2006; BRASIL, 2012a). Desta forma, o FPS reflete a proteção da pele exclusivamente contra à radiação UVB. No Brasil, a determinação do FPS deverá ser realizada exclusivamente *in vivo*, seguindo as metodologias da COLIPA ou FDA (BRASIL, 2012a).



Já a determinação do nível de proteção UVA deverá ser realizada conforme metodologia da Comissão Européia (2006), que consiste na avaliação da resposta da pigmentação da pele após a exposição à de radiação UVA de 2 a 4 horas, denominado de Pigmentação Persistente (PPD- *Persistent Pigment Darkening*). Além disso, também poderá ser avaliado por um método *in vitro*, por meio da determinação do fator de proteção UVA (FP-UVA) e do comprimento de onda crítico, que corresponde ao comprimento de onda no qual a área sob a curva é igual a 90% da área integrada entre 290-400 nm. Um fotoprotetor deve apresentar valor de comprimento de onda crítico superior a 370 nm, a fim de satisfazer os requisitos de proteção UVB/UVA de amplo espectro (BRASIL, 2012a).

De acordo com a ANVISA os protetores solares devem cumprir os requisitos de apresentar FPS de no mínimo 6 e Fator de Proteção UVA cujo valor corresponda a, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem (BRASIL, 2012a).

### **2.3.2. Avaliação da segurança de fotoprotetores**

Atualmente muitos métodos alternativos ao uso de animais de experimentação vêm sendo desenvolvidos e têm se tornado uma tendência mundial à avaliação de ingredientes e produtos cosméticos. O princípio em substituir o uso de animais em experimentação está baseado no conceito dos 3R's, cuja introdução foi realizada em 1957, por *William Russel* e *Rex Burch*, no livro *Principles of Human Experimental Technique*. Os 3R's representam o refinamento, redução e substituição (*Refine, Reduction and Replacement*) e têm como estratégia uma pesquisa racional minimizando o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico e almejando, futuramente, a total substituição de animais por modelos experimentais alternativos (BRASIL, 2012b).

Os experimentos envolvendo animais lidam com diversas questões, tais como questões éticas, custos e relevância dos resultados. As diferenças existentes entre as espécies são muitas vezes negligenciadas e muitos experimentos não foram devidamente validados, o que afeta a confiabilidade dos resultados. Por outro lado, os métodos alternativos *in vitro* passaram por um longo processo de validação até serem aceitos pelas agências regulatórias. Geralmente, apresentam baixo custo, possibilidade de automatização e aumento do número de replicatas, redução da variância entre os resultados e utilização de células relevantes para condições em humanos (GRUBER; HARTUNG, 2004).

A União Européia proíbe testes em animais de produtos acabados desde 2004 e em ingredientes cosméticos desde 2009. A partir de 2013, houve um banimento total, com a proibição da comercialização de cosméticos contendo ingredientes que foram testados *in vivo*

(VINARDELL, 2015). O processo visando a proibição do uso de animais em experimentação para testes em cosméticos durou cerca de 20 anos e contou com grandes investimentos na pesquisa científica. Além da União Européia, outros países como Noruega, Índia e Israel não permitem mais a utilização de animais para testes em cosméticos (LEE et al., 2016). Em março de 2019, a China aprovou nove métodos alternativos para regulamentação de produtos cosméticos.

No Brasil, o histórico envolvendo a proibição de testes em animais se iniciou em 2008, com o sancionamento da Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em experimentos científicos. Ela foi responsável pela criação do CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal), órgão integrante do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), cujo objetivo principal é a utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica (BRASIL, 2008).

Em 2012 houve a criação da RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos), que permitiu a existência de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais e de desenvolver e validar novos métodos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2014). Em 2014, o CONCEA reconheceu 17 métodos alternativos no Brasil e estabeleceu o prazo de até cinco anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo disponível (BRASIL, 2014; 2016b). Atualmente, 24 métodos alternativos, reconhecidos pela OECD, são também reconhecidos no Brasil, conforme demonstrado na Tabela 2.

De acordo com a ANVISA, os estudos clínicos deverão ser conduzidos somente após a confirmação da ausência de toxicidade *in vitro*, e em conformidade com os princípios éticos, evitando, desta forma, que sejam oferecidos riscos para os voluntários. Esses estudos consistem em dois grandes grupos: estudos de compatibilidade (condições maximizadas), os quais compreendem os testes de irritação primária, fotoirritação, *soap chamber test*, comedogenicidade, sensibilização dérmica e fotossensibilização e, ainda, estudos de aceitabilidade (condições reais de uso), os quais incluem avaliação da acnegenicidade, comedogenicidade, teste para pele sensível e aceitabilidade ocular (BRASIL, 2012b). Há um valor preditivo nesses estudos, entretanto os resultados negativos não significam ausência total de eventuais reações nos usuários (BRASIL, 2012b).

**Tabela 2-** Métodos alternativos reconhecidos no Brasil

<b>Ensaio</b>
<b>- Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:</b>
1) OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de resistência elétrica transcutânea
2) OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da epiderme humana reconstituída
3) OECD TG 435 - Teste de barreira de membrana <i>in vitro</i>
4) OECD TG 439 - Teste de irritação cutânea <i>in vitro</i>
<b>- Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:</b>
5) OECD TG 437 - Teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina
6) OECD TG 438 - Teste de olho isolado de galinha
7) OECD TG 460 - Teste de permeação de fluoresceína
8) OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares
9) OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído
<b>- Avaliação do potencial de Fototoxicidade:</b>
10) OECD TG 432 - Teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
<b>- Avaliação da absorção cutânea:</b>
11) OECD TG 428 - Absorção cutânea método <i>in vitro</i>
<b>- Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:</b>
12) OECD TG 429 - Sensibilização cutânea: ensaio do linfonodo local
13) OECD TG 442 - Versão não radioativa do ensaio do linfonodo local
14) OECD TG 442B - Versão não radioativa do ensaio do linfonodo local
15) OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i>
16) OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>
<b>- Avaliação de toxicidade aguda:</b>
17) OECD TG 420 - Toxicidade aguda oral – procedimento de doses fixas
18) OECD TG 423 - Toxicidade aguda oral – classe tóxica aguda
19) OECD TG 425 - Toxicidade aguda oral – procedimento "Up and Down"
20) OECD TG 129 - Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica
<b>- Avaliação de genotoxicidade:</b>
21) OECD TG 487 - Teste do micronúcleo em célula de mamífero <i>in vitro</i>
<b>- Avaliação de toxicidade reprodutiva:</b>
22) OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento
23) OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva
<b>- Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:</b>
24) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)

Fonte: Brasil (2014, 2016b)

### 2.3.2.1. Avaliação da fototoxicidade

A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica aguda observada após uma primeira exposição a agentes químicos, e posterior exposição à radiação. Uma vez que os testes para a avaliação da segurança de cosméticos *in vivo* não são mais permitidos na Europa, a OECD estabeleceu algumas estratégias para a determinação do potencial fototóxico *in vitro*, a

fim de maximizar o potencial de cada teste e reduzir as avaliações desnecessárias (LIEBSCH et al., 2005).

O primeiro passo para a determinação do potencial fototóxico de uma substância consiste no emprego do teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3 (3T3 NRU PT: 3T3- *Neutral Red Uptake- Phototoxicity Test*). Esse ensaio se baseia na determinação da viabilidade das células tratadas com a substância ativa, em oito concentrações diferentes, quando submetidas ou não à irradiação UVA. Caso a substância seja classificada como não-fototóxica, testes adicionais não serão necessários, uma vez que a elevada sensibilidade desse teste impossibilita a ocorrência de resultados falso- negativos (LIEBSCH et al., 2005, GASPAR et al., 2018; OECD, 2004).

Por outro lado, se as substâncias apresentarem potencial fototóxico, a estratégia recomendada é que se confirme esse resultado em modelo de pele humana reconstituída. A presença de estrato córneo do modelo, a capacidade metabólica e a possibilidade de aplicação de formulações e concentrações reais da substância proporcionam resultados mais relevantes às condições reais de uso dos produtos cosméticos (KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018).

Esse ensaio baseia-se na comparação da citotoxicidade de substâncias quando submetidas ou não à irradiação UV e é expressa como a redução da conversão mitocondrial do MTT em cristais de formazan, após um dia do tratamento e exposição ao UVA (LIEBSCH et al., 2005; CERIDONO et al., 2012; KEJLOVÁ et al., 2007). Embora a validação desse teste não tenha sido completada, ele é internacionalmente aceito e utilizado há mais de 20 anos (KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018).

Por fim, se as substâncias em estudo não apresentarem potencial fototóxico no modelo de pele humana reconstituída, os testes clínicos para avaliação do potencial fototóxico e fotoalergênico (*photopatch*) poderão ser conduzidos. Os resultados negativos para tais testes em humanos indicam que as substâncias podem ser consideradas seguras para uso tópico.

Uma vez que a geração de EROs é um dos principais mecanismos envolvidos na fototoxicidade, um novo ensaio foi incluído recentemente na estratégia de avaliação do potencial fototóxico. O ensaio de fotorreatividade consiste na identificação de EROs, após irradiação das substâncias, com base em duas principais vias: transferência de elétrons (reação tipo I) que leva à geração de ânion superóxido e transferência de energia (reação tipo II) que leva à geração de oxigênio singlete (ONOUE et al., 2013; KOJIMA et al., 2018, OECD, 2019).

Este ensaio foi recentemente incluído pela OECD (OECD TG 495) e apresenta elevada sensibilidade (100%). Portanto, um resultado negativo para esse ensaio (não fotorreativo) indica que a substância não apresentará potencial fototóxico e, portanto, o estudo de fototoxicidade

não precisará ser realizado. Caso contrário, resultados positivos ou inconclusivos para esse ensaio sugerem que a substância pode apresentar potencial fototóxico, e, portanto, o estudo de fototoxicidade 3T3 NRU PT deverá ser conduzido (ONOUE et al., 2013; KOJIMA et al., 2018; OECD, 2019).

### 2.3.2.2. Avaliação da genotoxicidade / fotogenotoxicidade

A genotoxicidade compreende um processo pelo qual um agente produz um efeito deletério no DNA e outros alvos celulares que controlam a integridade do material genético. Já a fotogenotoxicidade se caracteriza por uma resposta genotóxica observada após a exposição de uma substância fotossensibilizante a uma dose de radiação UV não genotóxica (SPIELMANN et al., 2000). A avaliação da fotogenotoxicidade é considerada relevante quando uma substância apresenta espectro de absorção no UV/VIS (290-700 nm), alto coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon > 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e potencial fototóxico. Dessa forma, os filtros solares são bons candidatos para a avaliação do potencial fotogenotóxico, uma vez que preenchem os requisitos citados acima (GOCKE et al., 2000; LYNCH et al., 2011).

Embora a avaliação da fotogenotoxicidade seja importante, ela não é considerada mandatória pelos órgãos regulatórios, e, portanto, não existem protocolos cientificamente validados para esse *endpoint*. Desta forma, os ensaios para a avaliação do potencial fotogenotóxico consistem, geralmente, em adaptações dos ensaios de genotoxicidade, com o acréscimo da radiação UV (LYNCH et al., 2011; AMAR et al., 2015).

Devido à natureza diversa dos mecanismos envolvidos na genotoxicidade, sabe-se que nenhum teste quando utilizado individualmente é capaz de prever todos os efeitos genotóxicos. A *Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)* recomenda que os testes forneçam informações acerca dos seguintes *endpoints* genéticos: mutagenicidade em nível gênico, aberrações cromossômicas estruturais (clastogenicidade) e aberrações cromossômicas numéricas (aneugenicidade). A bateria de testes *in vitro* recomendada compreende o teste de *Ames* e de mutação gênica em células de mamíferos, os quais fornecem informações acerca da mutagenicidade em nível gênico e os testes do micronúcleo e de aberração cromossômica, os quais fornecem informações acerca da clastogenicidade e aneugenicidade (SARGENT; TRAVERS, 2016; CORVI; MADIA, 2017).

Uma vez que os ensaios para avaliação da segurança de cosméticos em animais foram proibidos totalmente a partir de março de 2013, a confirmação dos resultados positivos obtidos para os referidos testes *in vitro* não poderá mais ser realizada em animais. Desta forma, novas

estratégias foram implementadas e muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novos métodos *in vitro*, alternativos à experimentação animal (VINARDELL,2015).

O ensaio do cometa *in vitro*, apesar de não ter sido validado para fins regulatórios, é amplamente utilizado, uma vez que apresenta baixo custo, alta sensibilidade, fácil execução, além da possibilidade de utilização de diferentes linhagens celulares (TICE et al., 2000). Neste ensaio que inclui eletroforese, o DNA que possui algum tipo lesão migrará para longe do núcleo que apresenta DNA íntegro, o que resulta às células o aspecto de um cometa. Assim, a extensão e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem a intensidade do dano de um composto, sendo que quanto maior a cauda, maior o dano no material genético. Essas lesões são ainda passíveis de serem eliminadas pelo sistema de reparo, podendo ou não ser fixadas no DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

Embora muitos ensaios *in vitro* sejam aceitos pelas agências regulatórias para a avaliação de genotoxicidade de compostos, os mesmos apresentam muitas limitações, tais como ausência de competência metabólica das linhagens celulares utilizadas, exposição a altas doses das substâncias químicas que muitas vezes não correspondem à dose real utilizada, uso de linhagens celulares que não são relevantes para prever parâmetros genotóxicos e hipersensibilidade em comparação com situações *in vivo*. Esses fatores contribuem para a obtenção de resultados falso positivos, que na maioria das vezes não são confirmados *in vivo*, acarretando na perda desnecessária de novos ingredientes para a indústria cosmética (KIRKLAND et al., 2007; REISINGER et al., 2018).

Kirkland et al., 2005 demonstraram que a especificidade (capacidade de identificar corretamente compostos não-carcinogênicos) do teste de *Ames* varia de 74% - 80%, quando utilizado isoladamente. No entanto, a associação desse ensaio com o teste de mutação gênica em células de mamíferos e de aberração cromossômica, conforme exigido pela bateria de testes, diminuiu a especificidade para em torno de 5% -23%. Desta forma, foi demonstrado que a utilização da bateria de testes pode resultar em resultados falso-positivos (KIRKLAND et al., 2005).

Tendo em vista esse panorama, a *Cosmetic Europe* (antiga COLIPA) iniciou há alguns anos uma força tarefa para abordar as principais limitações da avaliação do potencial genotóxico *in vitro*, e coordenou três projetos, denominados de “*false positives*”, “*metabolism*” e “*3D skin model*”, este último, com a validação dos ensaios do cometa e micronúcleo em modelo de pele reconstituída. A fases iniciais da validação desses ensaios demonstraram alta capacidade de predição e boa reprodutibilidade inter e intra-laboratorial e ela ainda está em andamento (PFUHLER et al., 2010).

A utilização de um modelo de pele reconstituída para a avaliação da genotoxicidade de compostos constitui uma alternativa interessante ao modelo *in vitro* tradicional, uma vez que a presença do estrato córneo, a competência metabólica do modelo e a possibilidade da utilização de concentrações reais da substância tornam os resultados mais relevantes e próximos às condições reais de uso dos produtos cosméticos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; REISINGER et al., 2018).

## **3. OBJETIVOS**



### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) em cultura celular, em modelo de pele humana reconstituída e em humanos.

### **3.2. Objetivos específicos**

3.2.1. Desenvolver e selecionar formulações fotoprotetoras, contendo diferentes associações dos filtros solares DHHB, metoxicinamato de etilexila, avobenzona e bemotrizinol, por meio da avaliação da fotoestabilidade, fotorreatividade, geração de EROs, potencial fototóxico e fotogenotóxico.

3.2.2. Avaliar a segurança e eficácia de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) associados a filtros solares

- Avaliar a citotoxicidade e atividade antioxidante;
- Avaliar o potencial fototóxico em modelo de pele humana reconstituída e a liberação de IL-6;

3.2.3. Determinar a eficácia clínica da formulação contendo a associação de filtros solares e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) no fator de proteção solar (FPS).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1. Materiais

### 4.1.1. Matérias-primas e reagentes

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

- Ácido acético glacial, PA, Synth;
- Agarose de baixo ponto de fusão, Código 16520050, UltraPure™, Invitrogen;
- Agarose ultra pura, Código 16500100, UltraPure™, Invitrogen;
- Álcool etílico, PA, Synth;
- Álcool isopropílico, grau HPLC, JT Baker;
- Álcool isopropílico, PA, Synth;
- Álcool metílico, grau HPLC, JT Baker;
- Alquil benzoato C12-15 (nomenclatura INCI: C12-15 ALKYL BENZOATE)- Crodamol™ AB, Croda;
- Avobenzona (nomenclatura INCI: BUTYLMETHOXYDIBENZOYLMETHANE; denominação INN: avobenzona)- Parsol® 1789, DSM;
- Base autoemulsificante B: álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico (nomenclatura INCI: CETEARYL ALCOHOL AND CETEARYL GLUCOSIDE)- Montanov 68®, Chemyunion;
- Bemotrizinol (nomenclatura INCI: BIS-ETHYLHEXYLPHEMOL METHOXYPHENYL TRIAZINE)- Tinosorb® S, BASF;
- BHT (denominação INN: Butil-hidroxitolueno);
- *Blend* de agentes de consistência hidrofílicos, emolientes e emulsificantes contendo hidroxietil acrilato e copolímero de acriloidimetiltaurato de sódio, esqualano, polissorbato 60- Simulgel NS®, Chemyunion;
- Ciclometicone volátil (INCI: CYCLOMETHICONE)- SF1204, GE Silicones;
- Cloreto nitroazul de tetrazólio, Código N6876, Sigma Aldrich;
- Clorpromazina, Código C8138, Sigma Aldrich;
- Colágeno G, Código L7213, Millipore;
- Copolímero Acrilamida/ Acrilonildimetil Taurato De Sódio /Isohexadecano & Polissorbato 80, Sepineo™ P600, Seppic;

- Corante vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) Código 1.01369.0025, Merck;
- DCFH<sub>2</sub>-DA (Alemanha), Código D399, Thermo Fisher;
- DCFH<sub>2</sub>-DA (Brasil), Código D6883, Sigma Aldrich;
- Dietilamino Hidroxibenzoil Hexil Benzoato (nomenclatura INCI: DIETYLAMINO HYDROXYBENZOYL HEXYL BENZOATE) (DHHB) - Uvinul<sup>®</sup> A Plus Granular, Basf;
- Dimetilsulfóxido, PA, (DMSO)- Synth;
- Fenoxietanol e parabenos (nomenclatura INCI: PHENOXYETHANOL (AND) METHYLPARABEN (AND) ETHYLPARABEN (AND) PROPYLPARABEN (AND) BUTYLPARABEN)- Phenova, Mapric;
- Glicerina, PA, Synth;
- Imidazol, Código I5513, Sigma Aldrich;
- Insetos de placas de cultura celular, Código PIHP01250, Millipore;
- Kit ELISA IL-6, Código 88-7066, Invitrogen ;
- L-Glutamina, código G7513, Sigma Aldrich;
- L-Histidina, código H8000, Sigma Aldrich;
- Manteiga de Illipê, Polytechno Indústrias Químicas Ltda;
- Meio DMEM (Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium) / HAM F-12 + Glutamax<sup>™</sup>, Código 31331-028, Gibco;
- Meio DMEM (Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium), código BR 30003-05, LGC Biotecnologia;
- Meio DMEM (Dulbeccos's Modification of Eagle's Medium), código D6546, Sigma Aldrich;
- Meio Epilife<sup>®</sup>, Código MEPI500CA, Gibco;
- Metoxicinamato de etilexila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL METHOXYCINNAMATE)- Uvinul<sup>®</sup> MC 80, Basf;
- Miristato de isopropila, Crodamol<sup>™</sup> IPM, Croda;
- MTT, Código M5655, Sigma Aldrich;
- Norfloxacin, código N9890, Sigma Aldrich;
- Óleo calêndula, Derma Clean;
- Penicilina - Streptomycin, código A5955, Sigma Aldrich;
- P-nitroso-N,N-dimetilanilina (RNO), Código D172405, Sigma Aldrich;
- Poloxamer, Pluronic<sup>®</sup> F68, Código P5556;

- Propilenoglicol, PA, Synth;
- Quercetina, Código Q4951, Sigma Aldrich;
- Quinina, Código Q1125, Sigma Aldrich;
- Salicilato de octila (nomenclatura INCI: ETHYLHEXYL SALICYLATE);
- Soro bovino fetal, código 12657029, Invitrogen;
- Tripsina, código T4174, Sigma Aldrich

#### **4.1.2. Equipamentos e acessórios**

- Agitador de microplacas, MTS 4 IKA, Schuttler;
- Agitador mecânico, modelo 713D, Fisatom;
- Aparelho Zetasizer (Malvern, NanoZS series);
- Balança analítica Shimadzu AUW220D;
- Balança semi-analítica, modelo BL-3200H, Marte;
- Cabine de segurança biológica, Classe II, PA 410 ECO, Pachane;
- Centrífuga, modelo EEQ-9004/A, Edutec;
- Centrífuga SL 700 Solab;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250 mm, 5  $\mu$ m);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, Shimadzu;
- Espectrofotômetro Agilent 8453;
- Estufa com termostato e controle de umidade Olidef CZ;
- Filtros com membrana em politetrafluoretileno (PTFE), com 0,45  $\mu$ m de porosidade e 13 mm de diâmetro, Millipore;
- Incubadora de CO<sub>2</sub>, Forma Series II Water-Jacket, Thermo Scientific;
- Leitor de microplacas Biotek Synergy 2;
- Microscópio invertido, modelo Primo Vert, Zeiss;
- Papel de filtro 15 cm de diâmetro e 25  $\mu$ m de porosidade, Quanty;
- Peagômetro, mPA-210 MS Tecnopon;
- Placa aquecedora, modelo 503, Fisatom;
- Radiômetro UV- meter (Dr Honle AG UV Technology) equipado com fotodetectores para a medida da radiação UVA;
- Simulador solar SOL-500 (Dr Honle AG, Planegg, Alemanha);

- Simulador solar *Multiport* equipado com uma lâmpada de arco de xenônio (*Solar Light Company, Philadelphia*);
- Sonicador Sonics VCX 750, ponta de 13 mm, amplitude de 40%;
- Sonicador Ultrasonic Clean Ultra Cleaner 750;
- Vórtex IKA MS2, Minishaker

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Desenvolvimento das formulações fotoprotetoras

#### 4.2.1.1. Elaboração das formulações

Foram elaboradas formulações fotoprotetoras a base dos filtros solares: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), metoxicinamato de etilexila, avobenzona e bemotrizinol. Para a determinação das concentrações das associações dos filtros solares empregadas nas formulações fotoprotetoras, foi utilizado o programa *BASF Sunscreen Simulator* (2015), por meio do qual foram determinadas quatro diferentes associações de filtros solares: associação 1 (4% avobenzona e 8% metoxicinamato de etilexila), associação 2 (4% DHHB e 8% metoxicinamato de etilexila), associação 3 (4% avobenzona, 8% metoxicinamato de etilexila e 3% bemotrizinol) e associação 4 (4% avobenzona, 8% metoxicinamato de etilexila e 5% bemotrizinol). As formulações F1, F2, F3 e F4 foram elaboradas com base em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (KAWAKAMI; GASPAR, 2015) e apresentaram fator de proteção solar (FPS) estimado de 15, 20, 25 e 30, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3-** Composição das formulações fotoprotetoras (% p/p)

Substância	F1	F2	F3	F4
Hidroxietilacrilato e copolímero de acriloldimetil-taurato de sódio, esqualano e polissorbato 60 (Simulgel <sup>®</sup> NS)	1,00	1,00	1,00	1,00
Miristato de isopropila	3,00	3,00	3,00	3,00
Propilenoglicol	2,00	2,00	2,00	2,00
Glicerina	2,00	2,00	2,00	2,00
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80
BHT	0,05	0,05	0,05	0,05
Álcool cetearílico e glucosídeo cetearílico (Montanov 68 <sup>®</sup> )	3,00	3,00	3,00	3,00
Alquilbenzoato C12-15	5,00	5,00	5,00	5,00
Ciclometicone	2,00	2,00	2,00	2,00
Avobenzona	4,00	-	4,00	4,00
Metoxicinamato de etilexila	8,00	8,00	8,00	8,00
DHHB	-	4,00	-	-
Bemotrizinol	-	-	3,00	5,00
Água q.s.p	100,00	100,00	100,00	100,00

#### **4.2.1.1.1. Testes preliminares de estabilidade**

As formulações em estudo foram submetidas a testes preliminares de estabilidade por centrifugação, determinação de pH e avaliação visual diária durante 15 dias quando mantidas no ambiente e quando submetidas ao estresse térmico à 45°C. No teste de centrifugação, cinco gramas de cada formulação objeto de estudo foram centrifugados a 3000 rpm, por 30 minutos, em centrífuga Centribio modelo 80 – 2B. Esse estudo foi repetido após 15 dias de armazenagem, tanto para as formulações mantidas no ambiente quanto para as formulações submetidas ao estresse térmico de 45°C. A medida de pH das formulações em estudo foi realizada utilizando peagômetro Tecnopon, modelo MS mPA-210 por meio de amostras diluídas em água destilada (10%), no tempo zero e após 15 dias de armazenagem, em temperatura ambiente e a 45°C. Na avaliação visual, foram consideradas, após prévio estoque em temperatura ambiente e a 45°C, as seguintes alterações: cor, separação de fases e homogeneidade (BRASIL, 2004).

#### **4.2.1.1.2. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores**

O estudo de fotoestabilidade foi realizado para as quatro formulações apresentadas na Tabela 3. As formulações contendo as diferentes associações de filtros solares foram submetidas ao estudo de fotoestabilidade por meio da determinação da porcentagem de absorção no UV (área sob a curva) e a porcentagem remanescente dos filtros solares em estudo presentes nas formulações irradiadas e não irradiadas, utilizando espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente.

##### **4.2.1.1.2.1. Irradiação das formulações e extração das substâncias em estudo**

Foram aplicadas 20 mg das formulações em lâminas de vidro, que após 15 minutos, foram expostas às doses de 275 kJ/m<sup>2</sup> e 360 kJ/m<sup>2</sup> de radiação UVA (KOCKLER et al., 2012; DAMIANI et al., 2007), emitida por um simulador solar SOL-500 (Dr Honle AG, Planegg, Alemanha), equipado com uma lâmpada de arco de mercúrio que simula a distribuição espectral da luz solar natural. Para cada lâmina submetida à irradiação houve um controle negativo, ou seja, uma lâmina deixada ao abrigo da luz (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006). As lâminas de vidro foram imersas em aproximadamente 20 mL de isopropanol para dissolução do filme seco em ultrassom, sendo as soluções resultantes filtradas em papel filtro (com porosidade de 25 µm), transferidas para balões volumétricos de 25 mL (BESERT et al., 1996, GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006, 2007) e o volume completado.

##### **4.2.1.1.2.2. Determinação da concentração remanescente dos filtros solares por CLAE**

As soluções resultantes foram submetidas à análise por CLAE em cromatógrafo à líquido da marca Shimadzu acoplado a 2 bombas e detector UV-VIS, em coluna de fase reversa C18 (Lichrospher 100RP18, 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) com modo de eluição por gradiente. As condições cromatográficas foram padronizadas e estão descritas a seguir:

Fase móvel (eluição por gradiente): eluição inicial constante de metanol: isopropanol: água com 2% de ácido acético (35:45:20) por 15 minutos, seguido por um gradiente linear de 0,5 minuto, o qual foi mantido com eluição constante de metanol: isopropanol: água com 2% de ácido acético (20:80:0) por 16,5 minutos. Fluxo da fase móvel de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, comprimento de onda da análise de 325 nm, volume de amostra injetado de 20  $\mu\text{L}$ , tempo de corrida de 42 minutos e temperatura ambiente.

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

O método de CLAE foi padronizado com base nos seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, precisão e exatidão intra e inter-ensaio, de acordo com o guia validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA (BRASIL, 2003).

Para avaliar a precisão e exatidão/recuperação do método 20 mg das formulações F2, F3 e F4, que continham todas as substâncias em estudo, foram aplicadas em lâminas de vidro, mantidas ao abrigo de luz por 15 minutos e posteriormente submetidas ao procedimento de extração.

Para a determinação da precisão e exatidão/recuperação intra-ensaio, foram avaliadas em sextuplicata, em um mesmo dia, amostras das formulações F2, F3 e F4. Já para a determinação da precisão e exatidão/recuperação inter-ensaio, foram avaliadas em triplicatas, amostras das mesmas formulações, durante três dias consecutivos.

#### **4.2.1.1.2.3. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV**

Após realização do procedimento de extração descrito no item 4.2.1.1.2.1, as soluções resultantes foram diluídas na proporção de 1:10 e analisadas em espectrofotômetro Hitachi U-2001 na faixa de 290 a 400 nm. Em seguida, foi determinada a porcentagem de absorção no UV (área sob a curva) das formulações irradiadas e não irradiadas.

#### **4.2.1.2. Avaliação da fotorreatividade dos fotoprotetores**



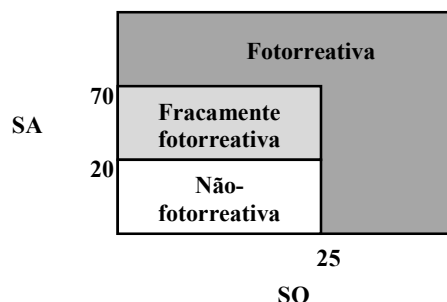
O estudo de fotorreatividade é baseado na geração de EROs: oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) (SO) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (SA), após irradiação da substância em estudo, de acordo com OECD TG 495 (OECD, 2019). Esse ensaio foi conduzido tanto para os filtros solares isolados a 200  $\mu\text{M}$  quanto para as quatro diferentes associações (A1, A2, A3 e A4), contendo a mesma proporção de filtros solares utilizados nas formulações em estudo. As concentrações dos filtros solares nas associações em estudo foram de 20  $\mu\text{M}$  para o MTX (8%), 12,5  $\mu\text{M}$  para o BMTZ (5%), 10  $\mu\text{M}$  para o DHHB e AVO (4%), e 7,5  $\mu\text{M}$  para o BMTZ (3%).

Para a determinação do oxigênio singleto (SO) foram adicionados em tubos de microcentrífuga tampão fosfato 20 mM pH 7,4; imidazol 0,2 mM, p-nitroso-N,N-dimetilanilina (RNO) 0,2 mM e as substâncias/associações em estudo, nas concentrações citadas acima. Para a determinação do ânion superóxido (SA), foram adicionados em tubos de microcentrífuga tampão fosfato 20 mM pH 7,4; cloreto nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,4 mM e as substâncias/associações em estudo. Os meios reacionais foram transferidos para placas de 96 poços, as quais foram submetidas a uma pré-leitura em 440 nm (para a determinação do SO) e 560 nm (para a determinação do SA) em leitor de microplacas (Bio-Tec Instruments, modelo  $\mu$  Quant), expostas a uma dose de radiação UVA (Simulador solar Dr. Hönle tipo SOL- 500 (Planegg, Alemanha) de 57  $\text{J}/\text{cm}^2$  e, em seguida, submetidas a uma nova leitura nos mesmos comprimentos de onda. Os ensaios foram realizados em triplicata (3 poços) em 2 corridas independentes (n=6) (ONOUE et al., 2013; OECD, 2019).

A geração de SO foi avaliada por meio do monitoramento do branqueamento do p-nitroso-N,N -dimetilanilina (RNO) como consequência da captura de SO pelo imidazol, o que resulta na diminuição da absorbância a 440 nm. Já a geração de SA foi avaliada por meio da redução do cloreto nitroazul de tetrazólio (NBT), o que leva ao aumento da absorbância a 560 nm.

O modelo de predição, descrito no protocolo *ROS assay* número 495 da OECD (2019) está demonstrado na figura abaixo:

**Figura 8-** Modelo de predição descrito no protocolo *ROS assay*, para a classificação de uma substância como não-fotorreativa, fracamente fotorreativa e fotorreativa



#### 4.2.1.3. Avaliação da geração de EROs por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA

A geração de EROs após irradiação UVA foi avaliada com filtros solares isolados: AVO, DHHB, MTX e BMTZ e com as diferentes associações dos mesmos, contendo a mesma proporção de filtros solares presentes nas formulações em estudo. Para tal, as substâncias foram diluídas em DMSO e submetidas a três diluições (10, 50 e 100 µg/mL) em tampão PBS, de forma que a concentração final de DMSO não excedeu 1%.

Para a realização do ensaio com DCFH<sub>2</sub>-DA,  $1 \times 10^5$  de células HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida, os poços foram lavados com tampão PBS, os filtros solares e as associações em estudo foram adicionadas nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL e as placas foram incubadas por 1h. Após esse período, 100 µL da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (10 µM) foram adicionados aos poços, seguido de incubação por 30 minutos. A seguir, as placas foram lavadas, adicionadas de tampão PBS e expostas ou não a uma dose de radiação UVA (Simulador solar Dr. Hönle tipo SOL- 500 (Planegg, Alemanha) de 4 J/cm<sup>2</sup> e, em seguida, submetidas a análise em leitor de microplacas acoplado a leitor de fluorescência nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 528 nm (emissão) (ALVES et al., 2016).

Os resultados foram expressos em % de fluorescência em relação ao controle não tratado (+UV), considerado 100%. Foram utilizados como controles a norfloxacin (100 µg/mL) e a quercetina (10 µg/mL). Os estudos foram realizados em triplicata.

#### 4.2.1.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

O teste de fototoxicidade foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da

captação do corante vital vermelho neutro, conforme Protocolo INVITTOX n° 78 e OECD TG 432 (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002; OECD, 2004).

O potencial fototóxico dos filtros solares: avobenzona, DHHB, metoxicinamato de etilexila e bemotrizinol, isoladamente e em associação, foi determinado por meio do teste em cultura de fibroblastos 3T3 NRU PT. Para tal, inicialmente, as substâncias foram diluídas em DMSO e submetidas a oito diluições geométricas sucessivas em PBS, com um fator de diluição constante de 1,47. Assim, as oito concentrações estudadas para as associações de filtros solares foram de 6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 µg/ mL.

Para avaliação do potencial fototóxico das quatro associações em estudo (A1, A2, A3 e A4), foram utilizadas as mesmas proporções de filtros solares utilizados nas formulações fotoprotetoras descritas na Tabela 3. As concentrações iniciais das substâncias em estudo em cada combinação foram: 100 µg/mL para MTX (8%), 62,5 µg/mL para BMTZ (5%), 50 µg/mL para AVO e DHHB (4%) e 37,5 µg/mL para BMTZ (3%). Essas preparações também foram diluídas para gerar amostras com oito concentrações diferentes em uma progressão geométrica (fator constante = 1,47).

Inicialmente, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura, contendo  $1 \times 10^4$  células/poço e, a seguir, foram inoculados em 60 poços centrais de cada microplaca. Uma microplaca foi utilizada para determinação da citotoxicidade (ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>, para a formação de uma camada semiconfluente.

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100 µL de oito diferentes concentrações de cada associação. As duas microplacas foram incubadas por 1 hora e, a seguir, uma delas foi submetida à uma dose de radiação UVA de 9 J/cm<sup>2</sup>, emitida por um simulador solar SOL-500 (Dr Honle AG, Planegg, Alemanha) para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com PBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas foram incubadas a 37°C por 20 horas.

A seguir, 100 µL de meio DMEM contendo uma solução de 50 µg/mL do corante vital vermelho neutro foi adicionado em cada poço e as células incubadas por 3 horas a 37°C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por etanol/ água/ ácido acético foi acrescentada em cada poço. As placas foram lidas a 540 nm em leitor de microplacas e os dados, analisados por meio do *Software Phototox* versão 2.0 (obtido pelo Zebet, Alemanha) para o cálculo do PIF

(“*photo irritation factor*”- fator de fotoirritação) e do MPE (“*mean photo effect*”- foto efeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico.

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

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

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

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

Em que, o fotoefeito (PE<sub>ci</sub>) em qualquer concentração (C) é definido como o produto do efeito resposta (RE<sub>c</sub>) e do efeito dose (DE<sub>c</sub>), ou seja, PE<sub>ci</sub>= RE<sub>c</sub> x DE<sub>c</sub>. O efeito resposta RE<sub>c</sub> é a diferença entre as respostas observadas na ausência e presença de radiação, ou seja, RE<sub>c</sub>= R<sub>c</sub> (-Irr)- R<sub>c</sub> (+Irr).

De acordo com o guia de determinação de fototoxicidade número 432 da OECD (2004), uma substância que apresenta PIF < 2 ou MPE < 0,1 prediz: “nenhuma fototoxicidade” PIF > 2 e < 5 ou MPE > 0,1 e < 0,15 prediz: “provavelmente fototóxico” e PIF > 5 e MPE > 0,15 prediz: “fototóxico”. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em sextuplicata. Foi utilizado como controle positivo a norfloxacin.

#### **4.2.1.5. Ensaio do cometa utilizando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT)**

Esse estudo foi realizado em colaboração ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (FCFRP), sob coordenação da Profa Dra Danielle Palma de Oliveira e auxílio da doutoranda Camila Alessandra Mini.

##### **4.2.1.5.1. Padronização da dose de radiação UV**

Previamente ao início do ensaio do cometa, foi avaliada a sensibilidade dos queratinócitos humanos à radiação UVA, por meio da avaliação da viabilidade celular utilizando o ensaio de captação do vermelho neutro (OECD, 2004). Para tal, foram avaliadas

cinco diferentes doses de radiação UVA (0, 4, 8, 16, 25 J/cm<sup>2</sup>), emitida por um simulador solar SOL-500 (Dr Honle AG, Planegg, Alemanha). O critério de aceitação determinado no estudo foi de uma viabilidade celular de pelo menos 80%. Posteriormente, as doses que proporcionaram viabilidade celular superior a 80% foram submetidas ao ensaio do cometa, conforme descrito no item 4.2.1.5.3., e então, a dose de radiação utilizada no estudo foi padronizada.

#### **4.2.1.5.2. Determinação da fototoxicidade da avobenzona**

Após a avaliação da sensibilidade das células à irradiação, foi realizado o ensaio para determinação do potencial fototóxico da avobenzona seguindo o protocolo OECD TG 432 (OECD, 2004), somente para a definição da concentração máxima a ser testada no ensaio do cometa. Para tal, foram inoculados, em duas placas de 96 poços, 1 x 10<sup>4</sup> células/ poço, sendo uma microplaca utilizada para determinação da citotoxicidade (ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foram adicionados em sextuplicata, 100 µL das diferentes concentrações da avobenzona (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) diluídos em DMSO/PBS. As duas microplacas foram incubadas por 1 hora e, a seguir, uma delas foi submetida a uma dose de radiação UVA de 4 J/cm<sup>2</sup> para a determinação da fototoxicidade; a outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e serviu como controle para a determinação da citotoxicidade. Após a irradiação, os poços foram lavados com PBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas foram incubadas a 37°C por 20 horas. A seguir, 100 µL de meio DMEM contendo uma solução de 50 µg/mL do corante vital vermelho neutro foram adicionados em cada poço e as células incubadas por 3 horas a 37°C.

Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço foi removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por etanol/ água/ ácido acético (50:49:1) foi acrescentada em cada poço. Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa. Para tal, foi utilizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas e não submetidas à radiação UVA, a 540 nm em leitor de microplacas.

#### **4.2.1.5.3. Ensaio do cometa**

Inicialmente, foram adicionados em duas placas de 12 poços, 2 x 10<sup>5</sup> células para cada série de diferentes concentrações da avobenzona, sendo uma placa utilizada para determinação da genotoxicidade (ausência de UVA) e a outra para a determinação da fotogenotoxicidade (na

presença de UVA). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as culturas celulares foram tratadas com as soluções testes de avobenzona em seis concentrações diferentes (2,5; 5; 10; 25; 50 e 100 µg/mL) por um período de 4 horas e em seguida, as células foram submetidas a uma dose de 4 J/cm<sup>2</sup> de radiação UVA.

Ao final da irradiação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram adicionados à suspensão de células, 140 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo que 60 µL foram distribuídos em lâminas pré-cobertas com agarose de alto ponto de fusão. As lâminas foram recobertas por lamínula, colocadas na geladeira por 20 minutos e em seguida, colocadas em uma solução de lise (NaCl 2,5M; EDTA 100mM, Tris 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%) por 24 horas.

Posteriormente, as lâminas foram transferidas para uma solução de eletroforese por 20 minutos (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH > 13) para promover a desnaturação do DNA e, em seguida, iniciou-se a corrida eletroforética (300mA, 25V, 20 minutos). Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (Tris 0,4M) por 20 minutos e fixadas com etanol absoluto por 5 minutos.

Para a leitura das lâminas, as mesmas foram coradas com 60 µL de brometo de etídeo (20 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência com o software *Comet IV* (*Perceptive Instruments Ltd, UK*). A análise da extensão do dano no DNA foi avaliada por meio do parâmetro *tail moment*, que representa a relação entre o comprimento e a intensidade da cauda do cometa. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que em cada experimento foram analisadas 100 células, distribuídas igualmente em duas lâminas (TICE et al., 2000; GOCKE et al., 2000). Os ensaios foram acompanhados do controle positivo (clorpromazina 2,5 µg/mL) e controle negativo (veículo DMSO 0,5%).

#### **4.2.1.5.4. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de tripan**

A fim de garantir o uso de células viáveis no ensaio cometa, foi feita a avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de tripan, paralelamente a esse ensaio. Para tal, uma alíquota de 15 µL da suspensão de células foi homogeneizada com 15 µL da solução de azul de tripan (0,25%) e em seguida, foram analisadas 100 células em Câmara de *Newbauer*. O ensaio do cometa era prosseguido se a viabilidade celular fosse superior a 80%.

#### **4.2.2. Avaliação da segurança e eficácia de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) associados a filtros solares**

A segunda parte do presente projeto envolveu a avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras contendo uma associação de filtros solares e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT). Os lotes de CLN foram preparados no Laboratório de Nanobiotecnologia da FCFRP da Profa. Dra. Priscyla D. Marcato Gaspari e a validação detalhada foi publicada em PIVETTA et al., 2019. Os itens 4.2.2.2., 4.2.2.3., e 4.2.2.5, foram realizados durante o período do doutorado sanduíche, na *Freie Universitat Berlin*, Alemanha, sob supervisão da Profa Dra Monika Schäfer-Korting, entre julho de 2018 e março de 2019.

#### **4.2.2.1. Preparação dos lotes de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)**

Os CLN foram preparados pelo método de emulsão e sonicação com os lipídeos naturais manteiga de Illipê (1%) e óleo de Calêndula que foram aquecidos a 50°C (PIVETTA et al., 2019). Em seguida foi adicionada a esta mistura uma solução aquosa contendo o estabilizante Pluronic F68 (1,5%, m/v) aquecido à mesma temperatura dos lipídeos. O sistema foi sonicado por 10 minutos em um sonicador de ponta (Sonics VCX, ponta de 13 mm e amplitude de 40%) e, em seguida, a dispersão foi resfriada em um banho de água até atingir a temperatura de 25°C, obtendo desta forma os CLN. Para a preparação dos CLN contendo quercetina, a quercetina foi adicionada na fase lipídica após a fusão do lipídio e em seguida seguiu-se o mesmo procedimento usado para a preparação dos CLN vazios.

##### **4.2.2.1.1. Caracterização dos lotes de CLN quanto ao diâmetro e potencial zeta**

As análises de diâmetro médio (z-average), índice de polidispersão e potencial zeta foram realizadas para os lotes específicos de CLN utilizados neste trabalho. Foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o aparelho Zetasizer, da Malvern (NanoZS 90, Malvern). Todas as medidas foram feitas com amostras diluídas em uma solução de KCl 1 mM.

##### **4.2.2.1.2. Avaliação da eficiência de encapsulamento**

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento, a dispersão de CLN-QT foi centrifugada a 5000 x g em um sistema de filtro Microcon com membrana de ultrafiltração com corte de massa molar de 10.000 g/mol (Millipore). O sobrenadante foi quantificado pelo método de espectrofotometria no UV-VIS ( $\lambda = 372$  nm) previamente validado (PIVETTA et al., 2019). A eficiência de encapsulamento (EE) da QT foi determinada segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ Quercetina} = \frac{[\text{Quercetina}]_{\text{inicial}} - [\text{Quercetina}]_{\text{filtrado}}}{[\text{Quercetina}]_{\text{inicial}}} \times 100$$

#### 4.2.2.1.3. Preparo dos CLN-QT associados aos filtros solares

Para avaliar a influência dos CLN-QT na associação de filtros solares foram desenvolvidas duas combinações fotoprotetoras diferentes: uma combinação contendo os filtros solares DHHB (4%) e MTX (8%) e a outra combinação contendo a mesma associação de filtros solares, adicionados de CLN-QT. CLN-QT, CLN-vazios e quercetina isolada (QT) também foram avaliados. A concentração final de quercetina na combinação foi de 0,04% (p / p) (Tabela 4).

**Tabela 4-** Ingredientes ativos presentes nas formulações fotoprotetoras

Componentes	Porcentagem em cada combinação (p/p)	
	Filtros solares	Filtros solares + CLN-QT
DHHB	4	4
MTX	8	8
CLN-QT	-	85
Pluronic F68	3	3

\*A concentração final de quercetina na formulação foi de 0,04% (p/p)

#### 4.2.2.2. Avaliação da citotoxicidade utilizando MTT

Queratinócitos humanos primários foram plaqueados em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço e incubados por 24h. Em seguida, as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) foram adicionadas nas concentrações de 50, 100, 500 e 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubadas por 1h. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS e incubadas por 24h. Após esse período, as placas foram incubadas com uma solução de MTT (0,5 mg/ mL) por 3h, o formazan foi extraído com DMSO e, e seguida, analisadas em leitor de microplacas em 540 nm. A viabilidade celular pelo ensaio MTT baseia-se na conversão do brometo de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5 difenil tetrazolio) em cristais de formazan por células vivas através de sua atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi determinada considerando o controle não tratado como 100%. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata.



#### **4.2.2.3. Avaliação da atividade antioxidante por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA**

Para a realização do ensaio com DCFH<sub>2</sub>-DA,  $1 \times 10^5$  de queratinócitos humanos primários foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados por 24h. Em seguida, os poços foram lavados com tampão PBS, as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) foram adicionadas nas concentrações de 50, 100, 500 e 750 µg/mL e as placas foram incubadas por 1h. Após esse período, 100 µL da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (50 µM) foram adicionados aos poços, seguido de incubação por 30 minutos. A seguir, as placas foram lavadas, adicionadas de tampão PBS e expostas a uma dose de radiação UVA (Simulador solar Dr. Hönle tipo SOL- 500 (Planegg, Alemanha) de 5 J/cm<sup>2</sup> e, em seguida, submetidas a análise em leitor de microplacas acoplado a leitor de fluorescência nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 528 nm (emissão) (ALVES et al., 2016). Os resultados foram expressos em % de fluorescência em relação ao controle não tratado (+UV), considerado 100%. Foram utilizados como controles a norfloxacin (100 µg/mL) e quercetina (10 µg/mL). Os estudos foram realizados em quintuplicata.

#### **4.2.2.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)**

O potencial fototóxico das substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) foi determinado conforme Protocolo INVITTOX n° 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002; OECD, 2004), descrito no item 4.2.1.4. As oito concentrações estudadas para os filtros solares e filtros solares + CLN-QT foram de 6,8; 10; 14,7; 21,5; 31,6; 46,4; 68,1 e 100 µg/ mL. Já para CLN-QT, CLN-vazios e QT foram utilizadas as concentrações: 0,99; 1,45; 2,14; 3,15; 4,63; 6,8; 10 and 14,7 µg/ mL.

#### **4.2.2.5. Modelo de pele humana reconstituída**

##### **4.2.2.5.1. Construção do modelo de pele reconstituída**

O estudo com pele humana reconstituída foi iniciado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Protocolo CEP-FCFRP n° 397) e da *Freie Universitat Berlin* (EA1/081/13).

Para a construção da derme, foi preparada uma matriz celular de colágeno, composta por colágeno G e fibroblastos humanos primários, os quais foram plaqueados em uma placa de 24 poços contendo inserto (membrana de poro 0,4 µm). As placas foram mantidas em estufa por 20h, e posteriormente, queratinócitos humanos primários foram adicionados ao modelo.

Em seguida, os tecidos foram cultivados em interface ar/líquido contendo meio de cultura apropriado por 7 dias, a fim de garantir a estratificação e diferenciação da epiderme (PENNACCHI et al., 2015). Amostras de pele foram fixadas em formalina (10%) e submetidas ao procedimento histológico de rotina e posterior coloração com hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica do desenvolvimento morfológico dos modelos em estudo.

#### **4.2.2.5.2. Avaliação da fototoxicidade em modelo de pele reconstituída**

Para o estudo da fototoxicidade, as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) foram aplicadas diretamente nos modelos de pele. Após 24 h de incubação os modelos foram submetidos à irradiação UVA (6 J/cm<sup>2</sup>), sendo que para cada modelo submetido à irradiação havia um mantido ao abrigo de luz (controle negativo). Após 24h, as placas foram incubadas com uma solução de MTT (1 mg/ mL) por 3h, o sal de formazan foi extraído por 2 h com isopropanol e as placas foram lidas à 570 nm (GASPAR et al., 2013; KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018). A viabilidade celular relativa foi calculada para cada tecido como porcentagem da média dos tecidos em relação ao controle negativo. A clorpromazina (0,02%) foi utilizada como controle positivo. O óleo de gergelim foi utilizado como veículo dos filtros solares e quercetina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.2.2.5.3. Quantificação da citocina inflamatória IL-6**

A citocina inflamatória IL-6 foi quantificada no meio de cultura do modelo de pele reconstituída, por método imunoenzimático, empregando kit *Invitrogen*, de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi coletado 24h após irradiação, armazenado em *freezer* -80 ° C e, posteriormente, submetido ao ensaio de ELISA.

#### **4.2.3. Determinação do FPS *in vivo* das formulações contendo CLN-QT associados aos filtros solares**

Esse estudo foi iniciado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Protocolo CEP-Allergisa nº 397). O estudo para determinação do FPS *in vivo* foi realizado seguindo a metodologia ISO 24444 pela empresa Allergisa Pesquisa Dermatocósmética LTDA (Campinas, SP) com quatro formulações fotoprotetoras (F1, F2, F3 e F4) (ISO, 2010). A formulação F1 continha apenas os filtros solares DHHB e metoxicinamato de etilxila, a formulação F2 continha os filtros solares adicionados de CLN-QT, a formulação F3

continha filtros solares associados à quercetina livre e a formulação F4 continha filtros solares adicionados de CLN-vazios (sem quercetina). A composição de cada formulação está descrita na Tabela 5.

As formulações fotoprotetoras foram aplicadas na região dorsal de 5 voluntários com pele fototipo I, II e III, de acordo com a escala de *Fitzpatrick*, na concentração de 2 mg/cm<sup>2</sup>. Em outra região foi aplicada uma formulação padrão de filtro solar contendo 7% de PABA e 3% de benzofenona-3, com FPS 16 (FPS médio esperado é na faixa de 13,7 a 18,5). Na última área não foi aplicado nenhum produto. Após 15- 30 min da aplicação, as regiões foram submetidas à irradiação UVB utilizando um simulador solar *Multiport* equipado com uma lâmpada de arco de xenônio (*Solar Light Company, Philadelphia*). A formação do eritema foi avaliada 16 a 24 horas após a irradiação. O FPS dos produtos para cada participante foi calculado como a razão entre a dose mínima eritematosa (MED) da pele protegida pelos produtos (MEDp) e a MED da pele não protegida (MEDu). A dose mínima eritematosa (MED) corresponde a menor dose de radiação UVB capaz de produzir eritema na pele, com bordas claramente definidas.

$$FPS = \frac{MEDp \text{ (pele protegida)}}{MEDu \text{ (pele desprotegida)}}$$

**Tabela 5-** Composição das formulações submetidas ao estudo de determinação do FPS *in vivo*

Componentes	Porcentagem em cada formulação (p/p)			
	F1	F2	F3	F4
Copolímero Acrilamida/ Acrilonildimetil Taurato De Sódio /Isohexadecano & Polissorbato 80	3,00	3,00	3,00	3,00
Base líquida de absorção de lanolina	3,00	3,00	3,00	3,00
Alquil benzoato C12-C15	2,00	2,00	2,00	2,00
Metoxicinamato de etilexila	8,00	8,00	8,00	8,00
DHBB	4,00	4,00	4,00	4,00
CLN-QT	-	76,00 *	-	-
Quercetina livre	-	-	0,04	-
CLN-vazios (sem ativo)	-	-	-	76,00 *
Fenoxietanol e parabenos	0,80	0,80	0,80	0,80
Propilenoglicol	1,30	1,30	1,30	1,30
Água	77,90	1,90	77,86	1,90

\*A concentração final de quercetina na formulação é de 0,04% (p/p)

#### **4.2.4. Análise estatística**

Os dados experimentais obtidos nos estudos de fotoestabilidade, do ensaio cometa, geração de EROs e atividade antioxidante (sonda DCFH<sub>2</sub>-DA) e FPS em humanos foram submetidos à análise estatística pelo teste paramétrico ANOVA, seguido pelo Teste de *Tukey* uma vez que os dados experimentais de todas as amostras apresentaram distribuição normal.

## **5. RESULTADOS**

## **5.1. Desenvolvimento das formulações fotoprotetoras**

### **5.1.1. Testes preliminares de estabilidade**

Após a centrifugação, todas as formulações foram consideradas estáveis, tanto no tempo zero quanto após 15 dias de armazenagem no ambiente e a 45°C, uma vez que apresentaram o mesmo aspecto, sem haver separação de fases.

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

Em relação à avaliação do pH após 15 dias de estocagem, foi observado que não houve alterações significativas durante o período de análise, tanto quando as formulações foram mantidas no ambiente quanto quando submetidas a 45°C, sendo que praticamente todas formulações apresentaram pH levemente ácido, na faixa de 5,56 a 6,01. Dessa forma, as formulações foram selecionadas para os testes de fotoestabilidade, uma vez que não houve mudanças significativas dos parâmetros analisados.

#### **5.1.1.1. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores**

##### **5.1.1.1.1. Desenvolvimento e padronização do método por CLAE**

###### **5.1.1.1.1.1. Linearidade**

As curvas analíticas foram elaboradas a partir da análise dos dados obtidos por CLAE. Todos os filtros solares apresentaram coeficientes de correlação linear (r) superiores a 0,99, o que nos permite afirmar que o método apresenta linearidade no intervalo de concentração analisado (BRASIL, 2003).

Curva analítica do DHHB:  $y = 35993,62.x - 32735,56$  (r= 0,9986)

Curva analítica do metoxicinamato de etilexila:  $y = 88695,76.x - 112203,57$  (r=0,9993)

Curva analítica da avobenzona:  $y = 69710,69.x - 188577,92$  (r= 0,9984)

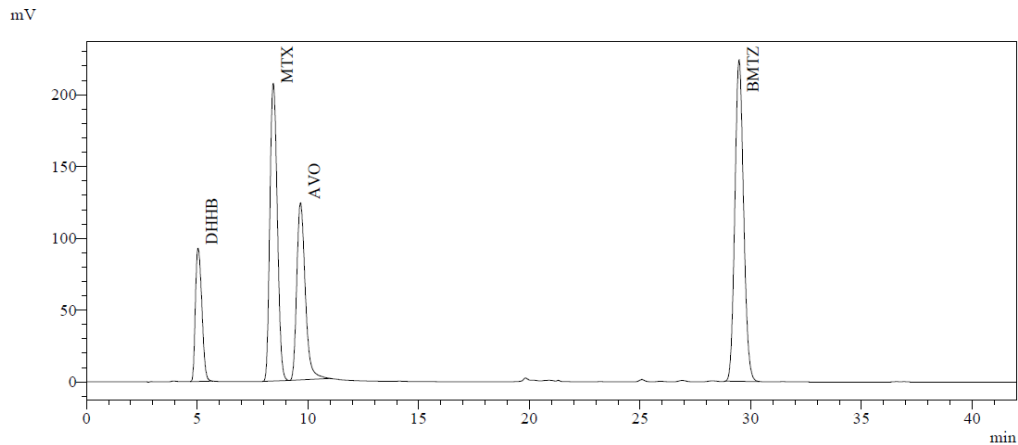
Curva analítica do bemotrizinol:  $y = 116851,79.x - 17841,68$  (r= 0,9984)

###### **5.1.1.1.1.2. Seletividade**

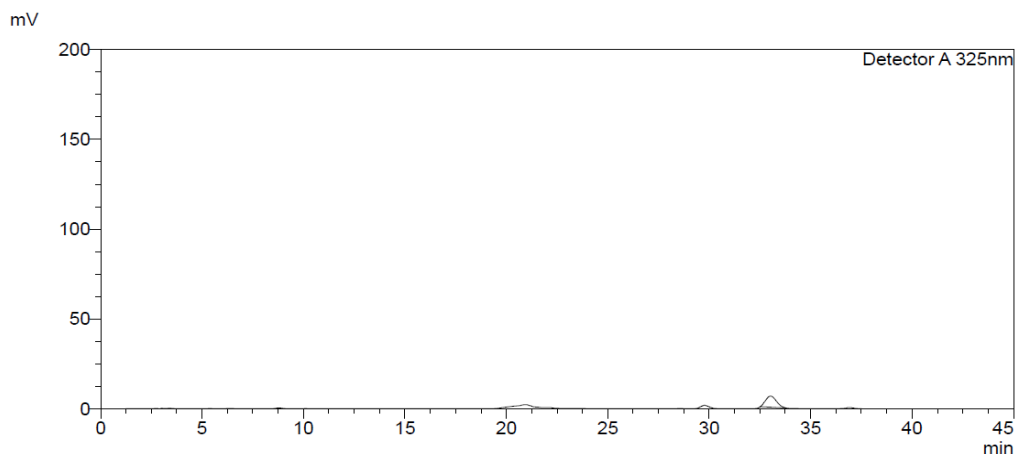
Os cromatogramas a seguir correspondem aos padrões de todos os filtros solares em estudo em uma mesma solução (Figura 9A) e ao veículo das formulações (Figura 9B). De acordo com os resultados o método se mostrou seletivo para as substâncias analisadas, e não houve interferência do veículo das formulações.

**Figura 9-** Perfil cromatográfico dos filtros solares em solução de isopropanol **(A)** Picos: Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB), Metoxicinamato de etilexila (MTX), Avobenzona (AVO) e Bemotrizinol (BMTZ) e da extração do veículo (formulação sem nenhum filtro solar) **(B)**

**(A)**



**(B)**



#### 5.1.1.1.3. Precisão e exatidão

Os valores de precisão e exatidão/recuperação intra e inter-ensaio estão apresentados na Tabela 6, nos quais se pode observar que o método pode ser considerado preciso e exato, uma vez que os valores de precisão não ultrapassaram o limite de 5% estabelecido e os valores de exatidão mantiveram-se na faixa de 80-120% (BRASIL, 2003).

**Tabela 6-** Precisão e exatidão intra e inter-ensaio. DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato; MTX: metoxicinamato de etilexila; AVO: avobenzona; BMTZ: bemotrizinol

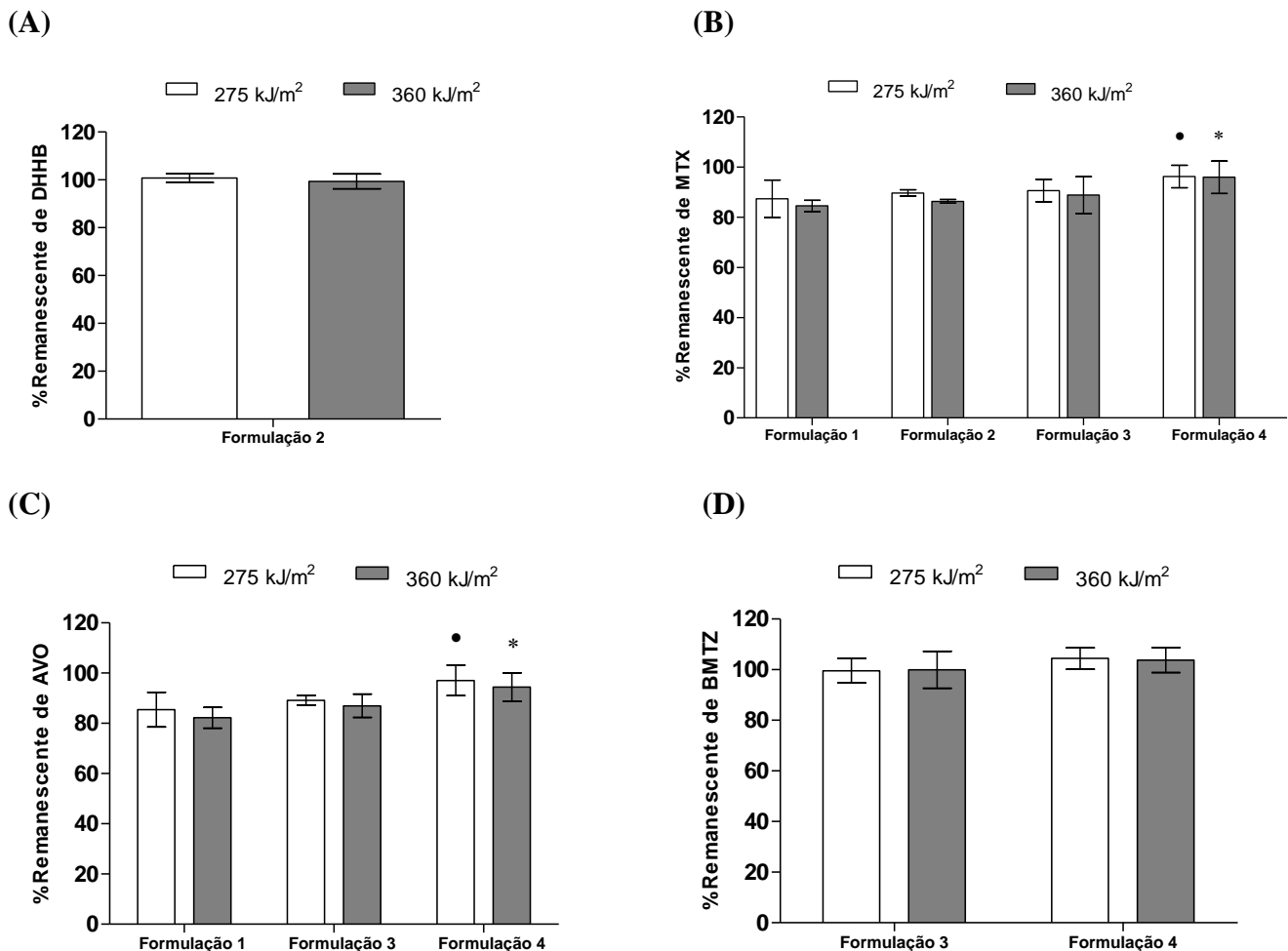
Substância	Formulação	Intra-ensaio (n=6)				Inter-ensaio (n=3)		
		Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão (%)	Concentração obtida± DP (µg/mL)	Precisão	Exatidão (%)
DHHB	F2	32	29,04± 0,26	0,90	90,75	29,28± 0,36	1,23	91,50
MTX	F2		66,67± 0,51	0,77	104,17	67,09± 0,69	1,02	104,83
	F3	64	66,03± 1,11	1,68	103,17	66,92± 1,42	2,12	104,56
	F4		66,90± 0,84	1,25	104,53	68,61± 1,71	2,49	107,20
AVO	F3	32	28,41± 0,26	0,91	88,78	28,23± 0,52	1,84	88,21
	F4		28,21± 0,31	1,10	88,15	28,84± 0,63	2,18	90,12
BMTZ	F3	24	22,88± 0,40	1,74	95,33	22,82± 0,50	2,19	95,08
BMTZ	F4	40	37,71± 0,44	1,16	94,27	38,56± 0,85	2,20	96,40

#### 5.1.1.1.4. Avaliação da fotoestabilidade dos fotoprotetores por CLAE

As concentrações dos filtros solares presentes nas formulações em estudo (irradiadas e não irradiadas), e os seus respectivos valores de concentração remanescente, estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10-** Porcentagem de (A) DHHB, (B) metoxicinamato de etilexila (MTX), (C) avobenzona (AVO) e (D) bemotrizinol (BMTZ) nas formulações F1 (MTX e AVO, F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), após irradiação por UVA. Teste ANOVA, n=3 (média e intervalo de confiança 95%)



● estatisticamente diferente das formulações (F1 e F3), submetidas à dose de 275 kJ/m<sup>2</sup> (p<0,001).

\* estatisticamente diferente das formulações (F1 e F3), submetidas à dose de 360 kJ/m<sup>2</sup> (p<0,001).

Ao se analisar os quatro filtros solares: metoxicinamato de etilexila, avobenzona, DHHB e bemotrizinol, foi observado que o DHHB e o bemotrizinol foram considerados fotoestáveis, uma vez que apresentaram porcentagens remanescentes próximas a 100% (Figura 10A e 10D). Por outro lado, o metoxicinamato de etilexila e a avobenzona foram considerados fotoinstáveis, uma vez que os valores obtidos nas formulações não irradiadas e irradiadas foram considerados estatisticamente diferentes (p<0,001). As porcentagens remanescentes do metoxicinamato de

etilexila e da avobenzona ficaram em torno de 88% e 86%, respectivamente (Figuras 10B e 10C).

Ao analisar a influência das diferentes associações de filtros solares (associações 1, 2, 3 e 4) na fotoestabilidade das substâncias em estudo, foi observado que a substituição da avobenzona pelo DHHB não promoveu melhora da fotoestabilidade do metoxicinamato de etilexila, uma vez que as porcentagens remanescentes desse filtro solar nas formulações F1 e F2 foram consideradas estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) (Figura 10B).

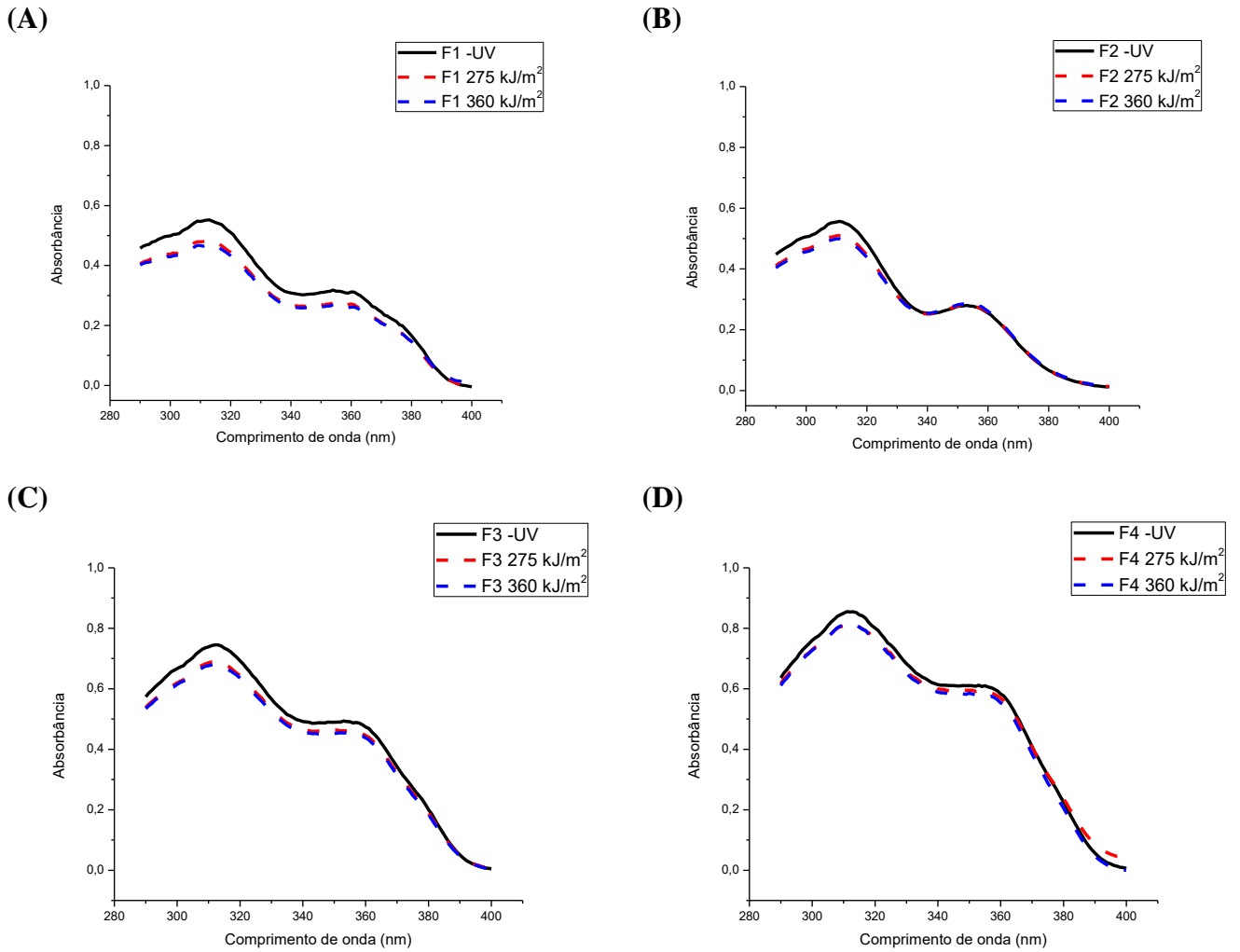
Foi também observado que o bemotrizinol a 5%, presente na formulação F4, promoveu um aumento significativo da fotoestabilidade do metoxicinamato de etilexila e da avobenzona quando comparada à formulação F1 (Figura 10B e 10C), uma vez que as porcentagens remanescentes desses filtros solares nas formulações F1 e F4 foram consideradas estatisticamente diferentes ( $p < 0,001$ ). Os valores das porcentagens remanescentes do metoxicinamato de etilexila ficaram em torno de 86% e 96%, quando avaliadas as formulações F1 e F4, respectivamente. Já os valores das porcentagens remanescentes da avobenzona ficaram próximos a 84% e 96%, quando avaliadas as formulações F1 e F4, respectivamente (Figuras 10B e 10C).

Por outro lado, foi observado que o bemotrizinol a 3%, presente na formulação F3 (contendo AVO, MTX e 3% de BMTZ) não promoveu uma melhora estatisticamente significativa da fotoestabilidade do metoxicinamato de etilexila e da avobenzona, quando comparada com a formulação F1 ( $p > 0,05$ ) (Figuras 10B e 10C).

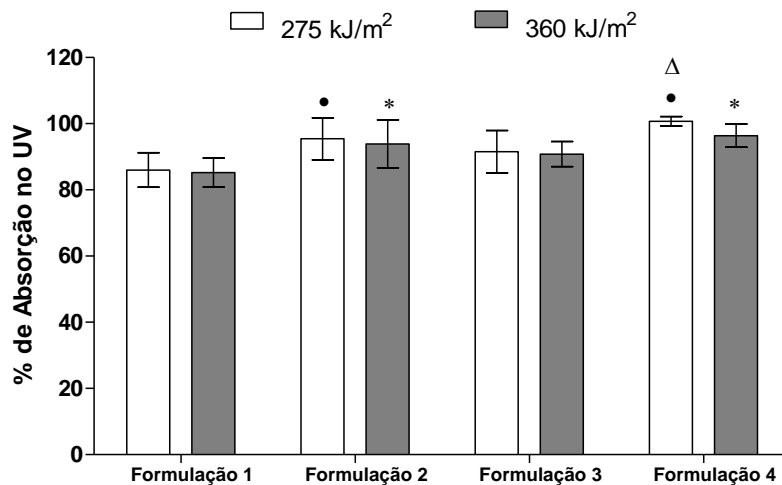
##### **5.1.1.1.5. Estudo de fotoestabilidade por espectrofotometria no UV**

As Figuras 11 e 12 representam, respectivamente, o espectro de varredura e as porcentagens de absorção (área sob a curva) no UV das formulações em estudo, quando submetidas ou não à irradiação.

**Figura 11-** Espectro de varredura das formulações em estudo: F1 (MTX e AVO, F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), quando submetidas ou não à irradiação UVA



**Figura 12-** Porcentagens de absorção no UV (área sob a curva) das formulações F1 (MTX e AVO), F2 (MTX e DHHB), F3 (MTX, AVO e 3% BMTZ) e F4 (MTX, AVO e 5% BMTZ), quando submetidas ou não à irradiação. Teste ANOVA, n=3 (média e intervalo de confiança 95%)



- estatisticamente diferente da formulação (F1) ( $p < 0,001$ ), submetida à dose de 275 kJ/m<sup>2</sup>.
- \*estatisticamente diferente da formulação (F1) ( $p < 0,001$ ), submetida à dose de 360 kJ/m<sup>2</sup>.
- Δ estatisticamente diferente da formulação (F3) ( $p < 0,001$ ), submetida à dose de 275 kJ/m<sup>2</sup>.

Quando os valores de área sob a curva foram analisados, podemos observar que as formulações F1 (contendo AVO e MTX) e F3 (contendo AVO, MTX e 3% de BMTZ) foram consideradas fotoinstáveis, uma vez que apresentaram valores estatisticamente menores que seus controles não irradiados ( $p < 0,001$ ) (Figuras 11A e 11C), para ambas as doses estudadas, 275 e 360 kJ/m<sup>2</sup>. As porcentagens de absorção no UV (área sob a curva) das formulações F1 e F3 submetidas à radiação UVA ficaram próximas a 86% e 91%, respectivamente (Figura 12).

Já as formulações F2 (contendo DHHB e MTX) e F4 (contendo AVO, MTX e 5% de BMTZ) foram consideradas fotoestáveis já que não houve diferença estatística significativa entre as formulações irradiadas e não irradiadas ( $p > 0,05$ ) (Figuras 11B e 11D). Foi observado que os valores de absorção no UV após irradiação da formulação F4 (99%) e F2 (95%) foram estatisticamente maiores que F1 (86%) ( $p < 0,001$ ); já a formulação F3 (91%) foi estatisticamente igual a F1 (Figura 12). Na Figura 11B podemos observar que a degradação da formulação F2 ocorreu principalmente na região do UVB, ou seja, praticamente não houve degradação na faixa do UVA, região de absorção do filtro solar DHHB. Tais resultados corroboram com os obtidos por CLAE.

### 5.1.2. Avaliação da fotoreatividade dos filtros solares e associações em estudo

Os resultados obtidos no estudo de fotorreatividade demonstraram que, dentre os filtros solares analisados isoladamente, apenas a avobenzona foi considerada fotorreativa, uma vez que este filtro solar apresentou valores de SO superiores a 25 (avobenzona SO: 43,33 e 62), o qual, de acordo com o modelo de predição (OECD, 2019) já é suficiente para a classificação de uma substância como fotorreativa. Uma vez que a geração de SA não foi considerada expressiva (avobenzona SA: 26 e -13,66), sugere-se que o principal mecanismo de fotorreatividade da avobenzona seja por meio da geração de SO (Tabela 7).

Em relação aos resultados obtidos no estudo de fotorreatividade das associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) foi observado que a associação A1 (contendo AVO e MTX) foi considerada fotorreativa, uma vez que apresentou valores de SO 42,66 e 42, também superiores a 25 (Tabela 7). Já a associação A4 (contendo AVO, MTX e 5% BMTZ) foi classificada como não-fotorreativa (SO: 20,66 e 23,33; SA: -22,66 e -23), o que nos sugere que o bemotrizinol a 5% presente nessa associação (A4) promoveu uma redução da fotorreatividade com relação à associação A1, que não continha esse filtro solar (Tabela 7).

Por outro lado, a associação A3 (contendo AVO, MTX e 3% BMTZ) foi considerada fotorreativa (SO: 27,66 e 26,66), sugerindo que o bemotrizinol a 3% não foi capaz de reduzir a fotorreatividade dessa associação (A3) com relação à associação 1 (A1) (Tabela 7). Por fim, a associação A2 (contendo DHHB e MTX) foi classificada como não-fotorreativa, já que os valores obtidos para a geração de SO (4,33 e 13,33) e SA (-21,66 e -22,33) se apresentaram dentro da faixa estabelecida para substâncias classificadas como não-fotorreativas (Tabela 7).

**Tabela 7-** Resultados obtidos no ensaio de fotorreatividade dos filtros solares isolados e das associações (n=2). C+: controle positivo, C-: controle negativo

Amostra	Análise	$^1\text{O}_2$ (SO)	$\text{O}_2^{\cdot-}$ (SA)	Classificação
		( $\Delta\text{A } 440 \text{ nm} \times 10^3$ )	( $\Delta\text{A } 560 \text{ nm} \times 10^3$ )	
DHHB	1	-1	-18	Não-fotorreativo
	2	-2	-20	
MTX	1	6	11	Não-fotorreativo
	2	9,66	-17,33	
AVO	1	62	26	<b>Fotorreativo</b>
	2	43,33	-13,66	
BMTZ	1	10,66	-39,66	Não-fotorreativo
	2	4,33	-39	
A1	1	42,66	-23	<b>Fotorreativo</b>
	2	42	-23	
A2	1	4,33	-21,66	Não-fotorreativo
	2	13,33	-22,33	
A3	1	27,66	-18	<b>Fotorreativo</b>
	2	26,66	-79	
A4	1	20,66	-22,66	Não-fotorreativo
	2	23,33	-23	
Quinina (C+)	1	433,33	357,33	<b>Fotorreativo</b>
Salicilato de octila (C-)	1	10,33	-6,33	Não-fotorreativo

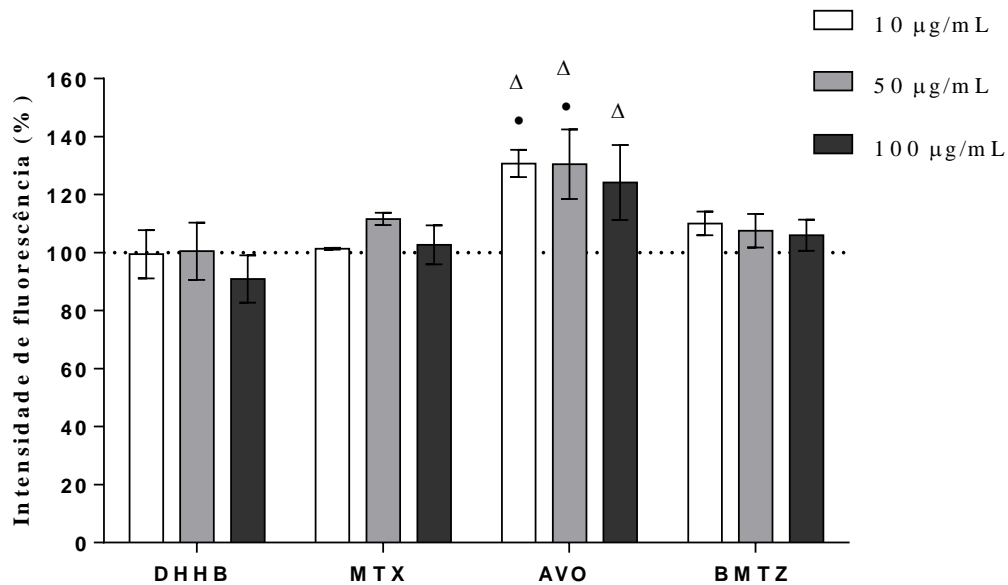
### 5.1.3. Avaliação da geração de EROs por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA

Os resultados do estudo de avaliação de geração de EROs demonstraram que a AVO (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) promoveu aumento estatisticamente significativo dos níveis de EROs intracelular após irradiação, elevando esses valores em 30% em relação ao controle irradiado ( $p < 0,01$ ) (Figura 13). Além disso, foi também observado que a AVO induziu a um aumento estatisticamente significativo na geração de EROs em relação ao DHHB, em todas as concentrações estudadas ( $p < 0,01$ ). Esse aumento ficou na faixa de 30% a 40% em relação ao DHHB (Figura 13).

Por outro lado, os filtros solares DHHB, MTX e BMTZ, nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , não induziram ao aumento na geração de EROs após irradiação, em relação ao controle irradiado ( $p > 0,05$ ) (Figura 13).

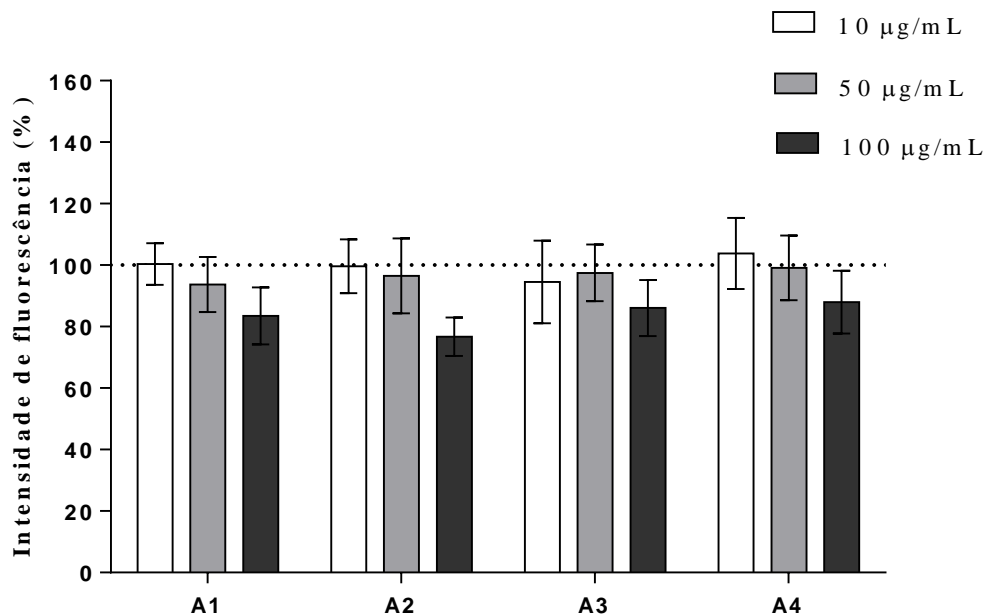
Já em relação as associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) não foi observado aumento estatisticamente significativo na geração de EROs após irradiação, em relação ao controle irradiado, sendo que os valores de fluorescência obtidos ficaram na faixa de 100% (Figura 14).

**Figura 13-** Geração de EROs intracelular pelos filtros solares DHHB, MTX, AVO e BMTZ, induzidos pela irradiação UVA ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM).



- Estatisticamente diferente do controle não tratado irradiado (NT) ( $p < 0,05$ )
- Δ Estatisticamente diferente da concentração correspondente do DHHB ( $p < 0,05$ )

**Figura 14-** Geração de EROs intracelular pelas associações em estudo (A1, A2, A3 e A4), induzidos pela irradiação UVA ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) ( $n=3$ , média  $\pm$  SEM)



#### 5.1.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

Os resultados do presente estudo demonstraram que a norfloxacina apresentou valores de MPE de 0,476 e 0,622, os quais estão dentro dos limites estabelecidos para essa substância (0,34-0,90) (OECD, 2004) (Tabela 9, Figura 15).

Em relação aos filtros solares analisados isoladamente, foi observado que a AVO e DHHB foram considerados fototóxicos, uma vez que apresentaram valores de MPE acima de 0,15, ou seja, acima do limite permitido para substâncias consideradas não fototóxicas. Por outro lado, o MTX e BMTZ foram classificados como não fototóxicos, uma vez que foram observados valores de MPE abaixo do limite de fototoxicidade ( $\text{MPE} < 0,15$ ) (Tabela 8).

Em relação às quatro associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) foi observado que nenhuma apresentou potencial fototóxico, uma vez que foram obtidos valores de MPE dentro da faixa aceitável para substâncias não fototóxicas. Os valores de MPE para as quatro associações ficaram entre -0,081 e 0,072 (Tabela 9, Figura 15).



**Tabela 8-** Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade dos filtros solares em estudo em cultura de fibroblastos (2 experimentos independentes em sextuplicata).

Substância	MPE	IC50 (-UV) µg/mL	IC50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
AVO	<b>0,227</b> <b>0,326</b>	69,84 39,41	12,15 11,52	5,76 3,49	<b>Fototóxico*</b>
DHHB	<b>0,182</b> <b>0,211</b>	73,23 14,02	20,51 1,82	3,59 8,74	<b>Fototóxico*</b>
MTX	-0,143 -0,065	ND ND	ND ND	1,00 1,00	Não fototóxico*
BMTZ	0,026 0,057	ND ND	ND ND	1,00 1,00	Não fototóxico*

\* Resultados previamente demonstrados por nosso grupo de pesquisa (KAWAKAMI; GASPAR, 2015; BENEVENUTO et al., 2015). Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. a: fototóxico. ND: não determinável.

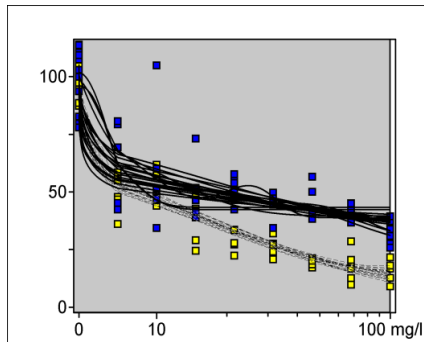
**Tabela 9-** Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) em cultura de fibroblastos (2 experimentos independentes em sextuplicata).

Substância	MPE	IC50 (-UV) µg/mL	IC50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
A1	0,072 0,068	ND 16,035	59,396 8,096	1,155 2,001	Não fototóxico
A2	-0,081 -0,056	37,025 9,991	53,221 33,543	0,699 0,304	Não fototóxico
A3	-0,026 0,031	51,598 ND	69,580 68,692	0,742 1,417	Não fototóxico
A4	-0,040 0,010	23,926 44,754	53,649 67,445	0,446 0,666	Não fototóxico
Norfloxacina (controle +)	<b>0,476</b> <b>0,622</b>	ND ND	37,298 16,167	2,686 6,199	<b>Fototóxico</b>

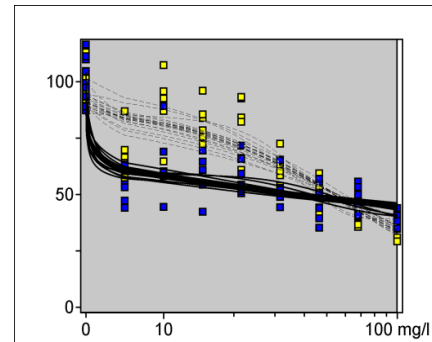
A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das associações de filtros solares em estudo, classificadas como não fototóxicas, as quais foram obtidas pelo Software Phototox versão 2.0.

**Figura 15-** Curvas dose-resposta das associações em estudo classificadas como não fototóxicas (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.)

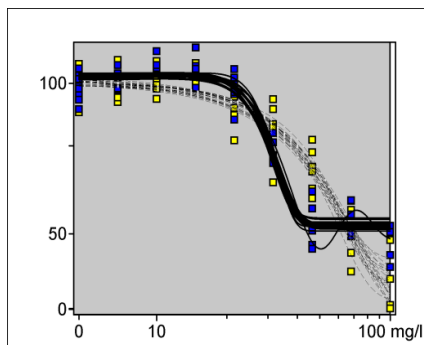
**(A) A1 (não fototóxico)**



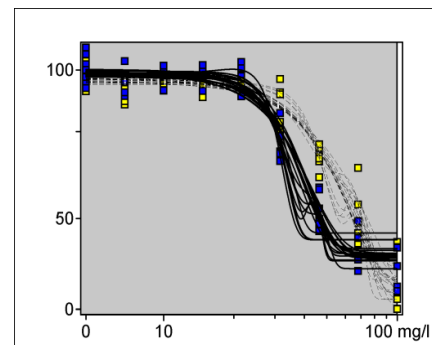
**(B) A2 (não fototóxico)**



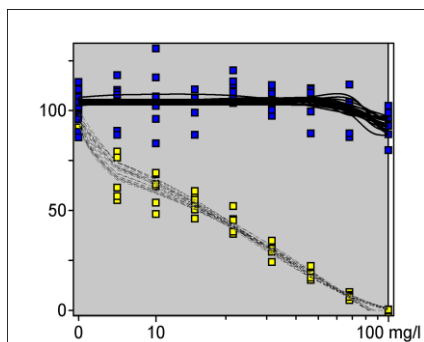
**(C) A3 (não fototóxico)**



**(D) A4 (não fototóxico)**



**(E) Norfloxacin (fototóxico)**



### 5.1.5. Ensaio do cometa utilizando queratinócitos humanos (HaCaT)

#### 5.1.5.1. Padronização das condições de irradiação

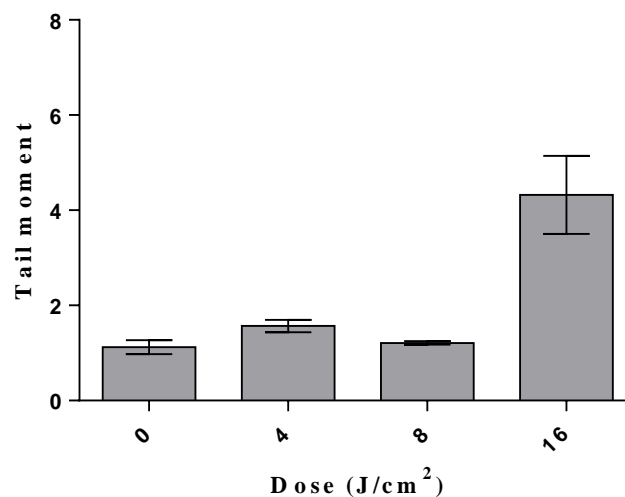
Os resultados obtidos no teste de sensibilidade à radiação UV estão apresentados na Tabela 10, na qual se pode observar que até a dose de 16 J/cm<sup>2</sup>, as células apresentaram viabilidade dentro dos critérios de aceitação, ou seja, de pelo menos 80%.

**Tabela 10-** Sensibilidade dos queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) à radiação UVA

Dose (J/cm <sup>2</sup> )	Viabilidade Celular (% em relação ao – UVA)
4	100,00
8	96,96
16	89,60
25	64,65

Em seguida, as células irradiadas com as doses de 4, 8 e 16 J/cm<sup>2</sup> foram submetidas ao ensaio do cometa, a fim de avaliar o efeito das diferentes doses de radiação sobre o DNA. A dose de 16 J/cm<sup>2</sup> induziu quebras do DNA, o que não foi observado nas demais doses avaliadas (Figura 16). Desta forma, a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> foi selecionada para dar prosseguimento aos ensaios posteriores, uma vez que na literatura, observa-se o emprego de doses na faixa de 0,6 J/cm<sup>2</sup> a 5 J/cm<sup>2</sup> (STRUWE et al., 2011; AMAR et al., 2015; PALUMBO et al., 2016) e que a proposta do estudo é a utilização de doses não genotóxicas.

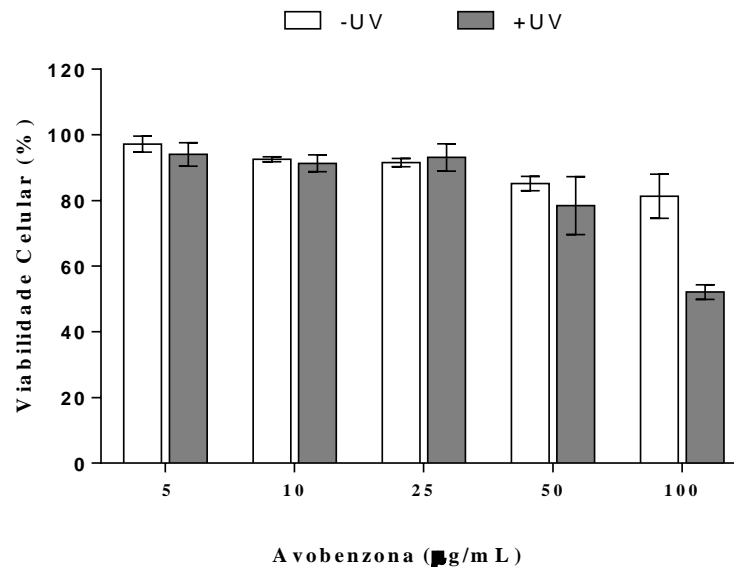
**Figura 16-** Efeito das diferentes doses de radiação UV sobre o DNA, observado pelo ensaio cometa, empregando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) (n=3, média ± SEM)



### 5.1.5.2. Determinação da fototoxicidade da avobenzona

Os resultados obtidos no ensaio de captação do vermelho neutro demonstraram que a viabilidade celular ficou acima de 80% quando as células foram tratadas com avobenzona nas concentrações de 5-100  $\mu\text{g/mL}$ , sem a presença da irradiação (Figura 17). Após a irradiação, foi observada uma redução da viabilidade celular apenas nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , as quais apresentaram valores de 78% e 52%, respectivamente (Figura 17). Dessa forma, considerando que a viabilidade das células submetidas ou não à irradiação foi superior a 50% para as concentrações de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , as mesmas foram selecionadas para os estudos posteriores de fotogenotoxicidade, utilizando o ensaio do cometa.

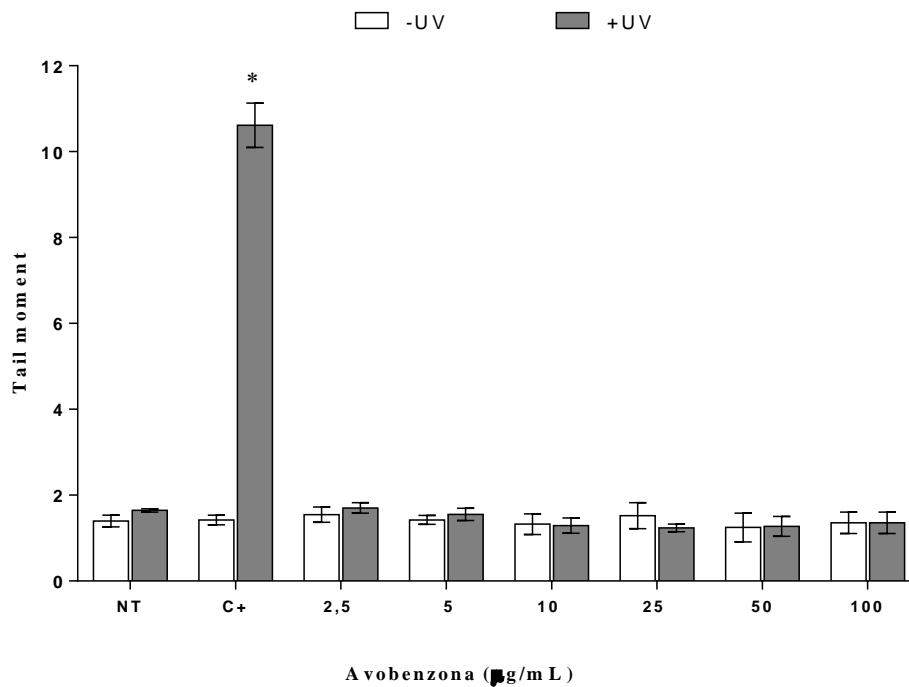
**Figura 17-** Resultados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio de captação do vermelho neutro (n=3, média  $\pm$  SEM)



### 5.1.5.3. Ensaio do cometa

Os resultados obtidos no estudo de fotogenotoxicidade demonstraram que as concentrações de 2,5 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de avobenzona não induziram quebras no DNA após exposição à radiação UVA, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os valores de *tail moment* obtidos nas amostras com relação ao controle não tratado (Figura 18).

**Figura 18-** Efeito da avobenzona sobre o DNA, observado pelo ensaio cometa, empregando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) (n=3, média  $\pm$  SEM)



\*  $p < 0,001$  estatisticamente diferente do controle não tratado. NT: controle não tratado. C+: controle positivo (2,5 µg/mL de clorpromazina), (n=3).

## 5.2. Avaliação da segurança e eficácia de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) associados a filtros solares

Os resultados que serão descritos abaixo compreendem a segunda parte do projeto de doutorado que envolveu a avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras contendo uma associação de filtros solares e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT).

Como descrito anteriormente, as quatro diferentes associações de filtros solares (A1, A2, A3 e A4) foram submetidas aos estudos de fotoestabilidade, fotorreatividade, geração de EROs intracelular, fototoxicidade e fotogenotoxicidade. Os resultados obtidos estão sintetizados na Tabela 11.

**Tabela 11-** Resumo dos resultados obtidos com as associações de filtros solares\*

<b>Resultado</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>AVO</b>
<b>Fotoinstável</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim
<b>Fotorreativo</b>	Sim	Não	Sim	Não	Sim
<b>Fototóxico</b>	Não	Não	Não	Não	Sim
<b>Geração de EROs</b>	Não	Não	Não	Não	Sim
<b>Fotogenotóxico</b>	-	-	-	-	Não

\***A1** (4% AVO, 8% MTX); **A2** (4% DHHB, 8% MTX); **A3** (4% AVO, 8% MTX, 3% BMTZ); **A4** (4% AVO, 8% MTX, 5% BMTZ).

### 5.2.1. Caracterização dos CLN-QT associados aos filtros solares

Os resultados de caracterização dos lotes de CLN-QT demonstraram que eles apresentaram perfil de distribuição de tamanho monomodal com diâmetro menor que 200 nm, baixa polispersão com PdI de 0,221 e potencial zeta negativo (-17 mV) (Tabela 12). Os resultados detalhados da caracterização dos CLN-QT estão demonstrados em Pivetta et al. (2019).

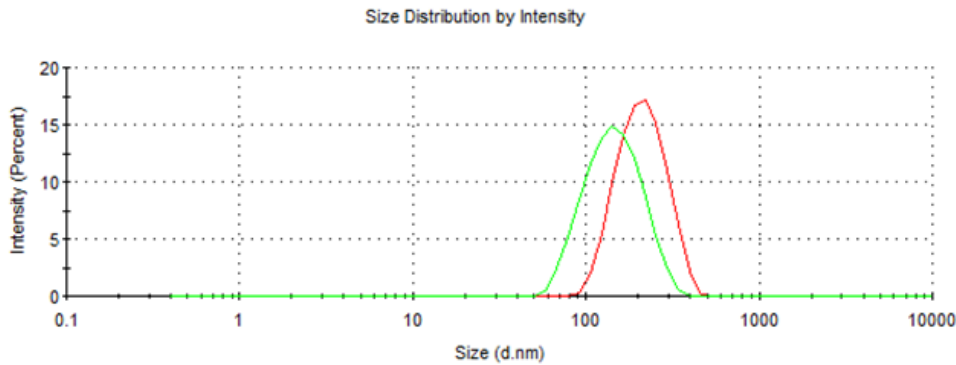
Já os CLN-QT associados aos filtros solares, cuja composição foi anteriormente demonstrada na Tabela 4, apresentou diâmetro maior, de 227,2 nm, porém manteve um perfil de distribuição monomodal e baixa polidispersão (PdI menor que 0,3) (Tabela 12).

A Figura 19 mostra a comparação do perfil de distribuição de diâmetro dos CLN-QT e CLN-QT + filtros solares.

**Tabela 12-** Valores de diâmetro e índice de polidispersão (PdI) dos CLN-QT associados ou não aos filtros solares (CLN-QT + filtros solares). CLN-QT: carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina

<b>Formulação</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>	<b>PdI</b>
CLN-vazios	119,6	0,222
CLN-QT	135,7	0,221
CLN-QT + filtros solares	227,2	0,287

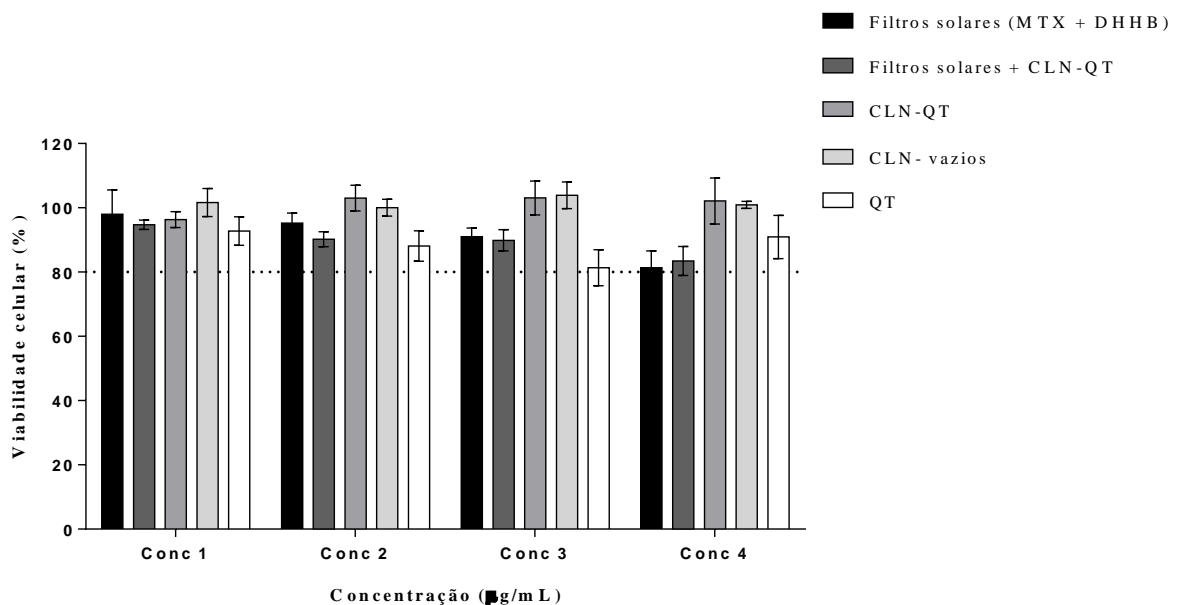
**Figura 19-** Comparação do perfil de distribuição de diâmetro dos CLN-QT e CLN-QT + filtros solares. CLN-QT: carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina. Curva em verde: CLN-QT; Curva em vermelho: CLN-QT + filtros solares.



### 5.2.2. Avaliação da citotoxicidade utilizando o corante MTT

Os resultados do teste de citotoxicidade utilizando o corante MTT demonstraram que todas as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) nas quatro concentrações estudadas proporcionaram viabilidade celular acima de 80%, quando comparados ao controle não tratado, portanto, não foram considerados citotóxicos (Figura 20).

**Figura 20-** Citotoxicidade das substâncias e combinações em estudo, utilizando queratinócitos humanos primários (n=5, média  $\pm$  SEM). Conc 1: 750  $\mu\text{g/mL}$  MTX, 375  $\mu\text{g/mL}$  DHHB e 3,75  $\mu\text{g/mL}$  QT (quercetina). Conc 2: 500  $\mu\text{g/mL}$  MTX, 250  $\mu\text{g/mL}$  DHHB e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  QT. Conc 3: 100  $\mu\text{g/mL}$  MTX, 50  $\mu\text{g/mL}$  DHHB e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  QT. Conc 4: 50  $\mu\text{g/mL}$  MTX, 25  $\mu\text{g/mL}$  DHHB e 0,25  $\mu\text{g/mL}$  QT.



### **5.2.3. Avaliação da atividade antioxidante das associações em estudo, utilizando a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA**

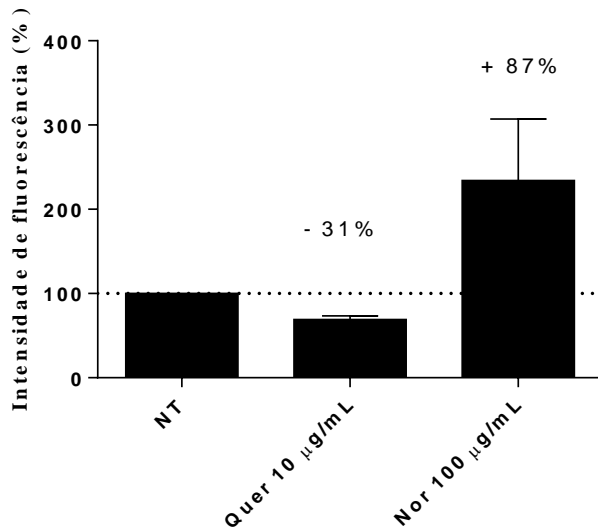
Os resultados do estudo de avaliação da atividade antioxidante demonstraram que o controle positivo norfloxacina (100 µg/mL) proporcionou um aumento na produção de EROs em torno de 87% em comparação ao controle não tratado (NT) (+ UV). Por outro lado, a quercetina (10 µg/mL) proporcionou uma redução na geração de EROs em torno de 31% após irradiação UVA (Figura 21A).

Os resultados mostraram que a associação de filtros solares em todas as concentrações estudadas não promoveu redução estatisticamente significativa dos níveis de EROs intracelular após a irradiação, em relação controle não tratado (considerado 100%) (Figura 21B). Por outro lado, a associação de filtros solares + CLN-QT (concentração final de quercetina 0,5; 2,5 e 3,75 µg/mL) proporcionou uma redução de cerca de 30% na geração de EROs em comparação ao controle não tratado e relação a combinação de filtro solares ( $p < 0,05$ ) (Figura 21B). Além disso, o tratamento com QT a 2,5 e 3,75 µg/mL proporcionou redução na produção de EROs em torno de 20%, em relação ao controle não tratado (+ UV) ( $p < 0,05$ ) (Figura 21B).

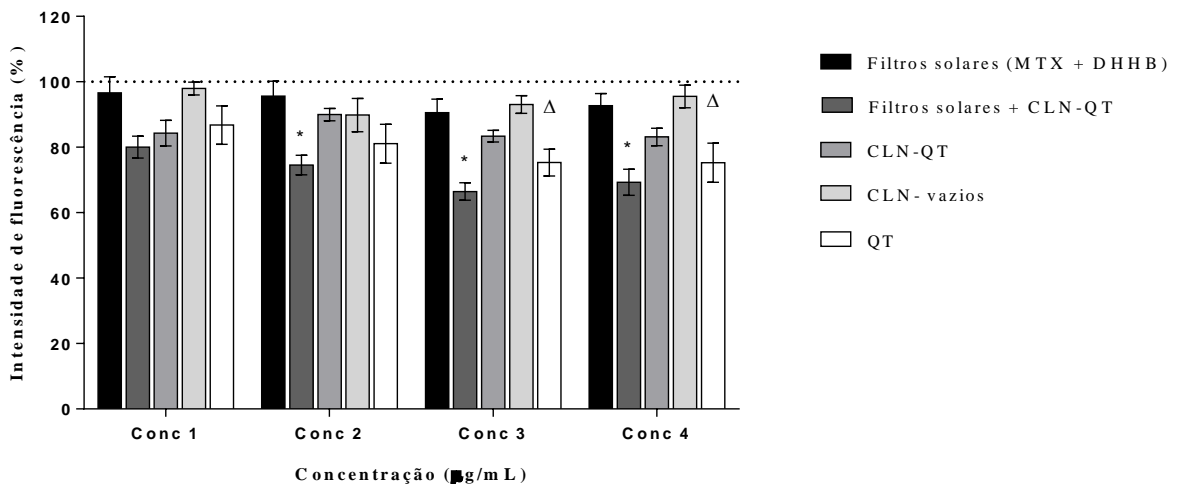


**Figura 21-** (A) Geração de EROs intracelular pelos controles quercetina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e norfloxacinina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) após irradiação (B) Atividade antioxidante das substâncias em estudo, após irradiação UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), utilizando a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (50  $\mu\text{M}$ ) (Média e SEM, n=5). Conc 1: 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MTX, 375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DHHB e 3,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QT (quercetina). Conc 2: 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MTX, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DHHB e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QT. Conc 3: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MTX, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DHHB e 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QT. Conc 4: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MTX, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DHHB e 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QT.

(A)



(B)



\* Estatisticamente diferente em relação aos filtros solares e em relação ao controle não tratado (100%).

$\Delta$  Estatisticamente diferente do controle não tratado (100%)

#### 5.2.4. Avaliação do potencial fototóxico em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU PT)

Os resultados do presente estudo demonstraram que a norfloxacin apresentou valores de MPE de 0,563 e 0,361, os quais estão dentro dos limites estabelecidos para essa substância (0,34-0,90) (OECD, 2004) (Tabela 13, Figura 22).

Em relação as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios, QT) foi observado que a quercetina (QT) apresentou potencial fototóxico, uma vez que foram obtidos valores de MPE de 0,284 e 0,324, os quais estão acima dos limites permitidos para a classificação de uma substância como não-fototóxica. Os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) apresentaram valores de MPE de 0,365 e 0,290, o que também os classifica como fototóxicos. Por outro lado, os filtros solares, filtros solares + CLN-QT e CLN-vazios não apresentaram potencial fototóxico, uma vez que foram obtidos valores de MPE dentro da faixa aceitável para substâncias não fototóxicas (MPE < 0,15) (Tabela 13, Figura 22).

**Tabela 13-** Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das associações em estudo em cultura de fibroblastos (N=2)

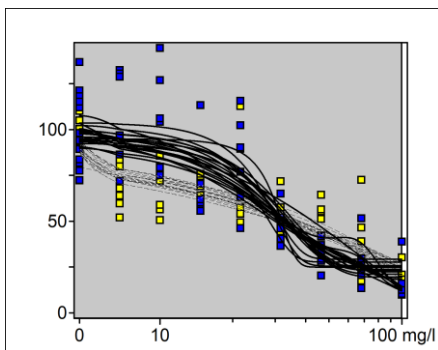
Substância	MPE	IC50 (-UV) µg/mL	IC50 (+UV) µg/mL	PIF	Probabilidade de apresentar fototoxicidade
Filtros solares (MTX e DHHB)	0,024 0,097	48,162 ND	59,352 38,436	0,860 0,931	Não fototóxico
Filtros solares + CLN-QT	0,034 -0,034	14,418 11,438	25,788 19,120	0,576 0,600	Não fototóxico
CLN-QT	<b>0,365</b> <b>0,290</b>	ND ND	ND ND	1,000 1,000	<b>Fototóxico*</b>
CLN-vazios	0,030 0,026	ND ND	ND ND	1,000 1,000	Não fototóxico*
QT	<b>0,284</b> <b>0,324</b>	ND ND	5,873 3,298	2,510 4,460	<b>Fototóxico*</b>
Norfloxacin (controle +)	<b>0,563</b> <b>0,361</b>	ND ND	18,321 24,402	5,464 4,117	<b>Fototóxico</b>

\*Resultados demonstrados previamente por Pivetta et al. (2019). Um PIF maior que 5 e/ou um MPE maior que 0,15 classifica a substância como fototóxica. <sup>a</sup>: fototóxico. ND: não determinável.

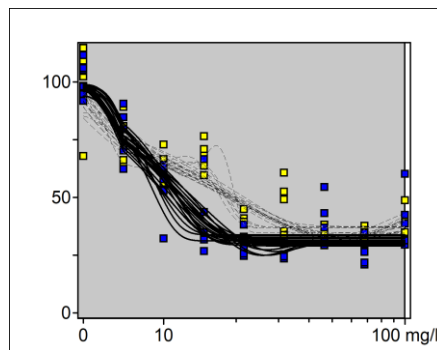
A seguir estão apresentadas as curvas dose-resposta das associações de filtros solares em estudo, classificadas como não fototóxicas, as quais foram obtidas pelo Software Phototox versão 2.0.

**Figura 22-** Curvas dose-resposta das associações em estudo classificadas como não fototóxicas (gráficos obtidos pelo Software Phototox versão 2.0.)

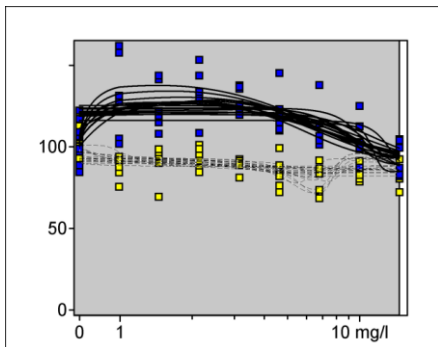
**(A) Filtros solares (não fototóxico)**



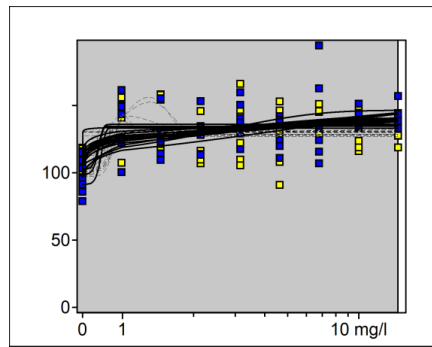
**(B) Filtros solares + CLN-QT (não fototóxico)**



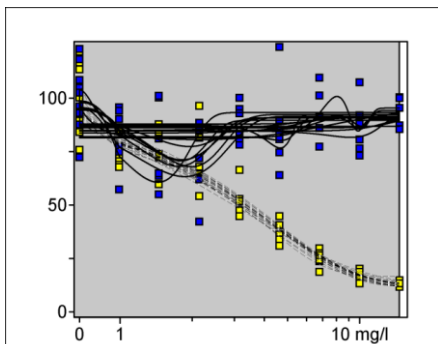
**(C) CLN-QT (fototóxico)**



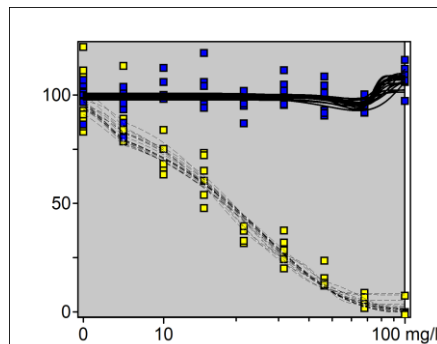
**(D) CLN- vazios (não fototóxico)**



**(E) QT (fototóxico)**



**(F) Norfloxacin (fototóxico)**

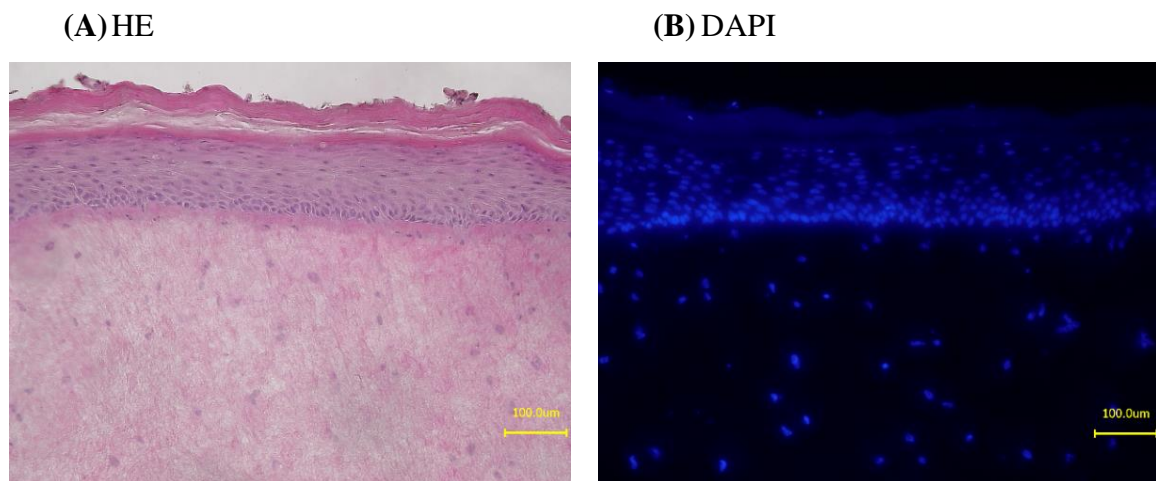


## 5.2.5. Modelo de pele humana reconstituída

### 5.2.5.1. Construção do modelo de pele reconstituída

Os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) e DAPI demonstraram que o modelo de pele reconstituída apresentou uma organização tecidual semelhante à pele humana, pois apresentou padrões corretos de diferenciação e estratificação epidérmica e espessura do estrato córneo adequadas (Figura 23A e 23B).

**Figura 23-** Análise histológica do modelo de pele reconstituída. (A) hematoxilina e eosina (HE) e (B) DAPI

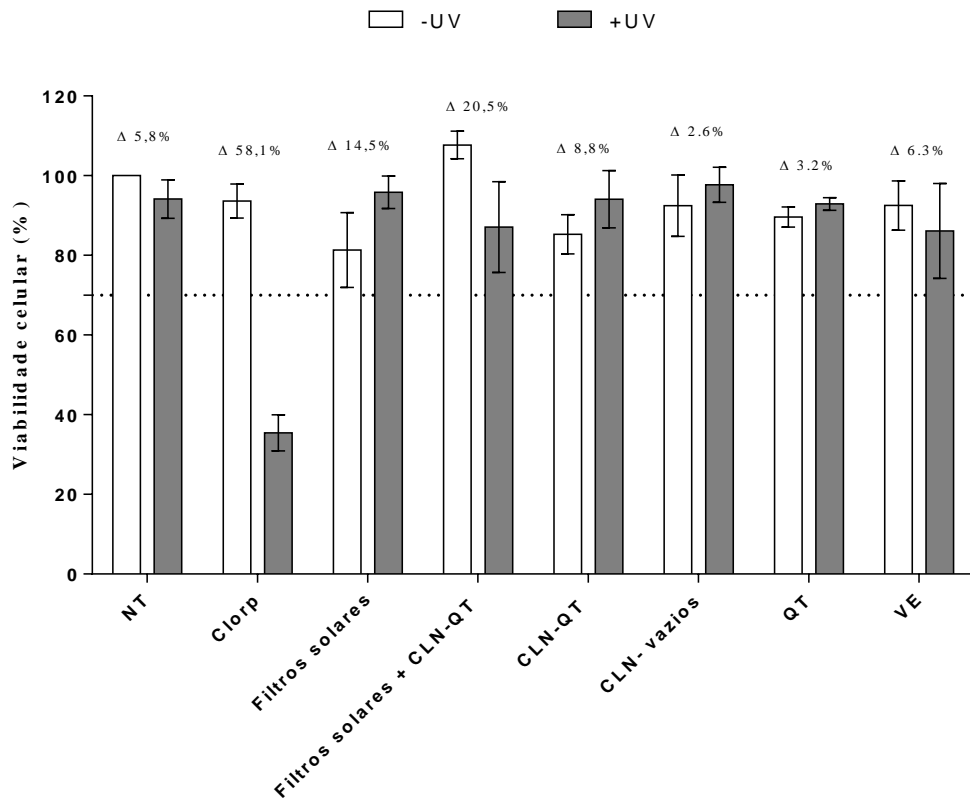


### 5.2.5.2. Avaliação da fototoxicidade em modelo de pele reconstituída

Os resultados do ensaio de fototoxicidade demonstraram que os modelos de pele tratados com o controle positivo clorpromazina (0,02%) apresentaram valores de viabilidade celular inferiores a 70% (Figura 24). Desta forma, a clorpromazina foi considerada fototóxica, o que está de acordo com os dados obtidos da literatura (KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018).

Por outro lado, não foi detectada fototoxicidade após a aplicação de todas as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT), uma vez que todos os tecidos irradiados (+UV) não apresentaram redução da viabilidade celular superior a 30% em relação aos seus pares não-irradiados (-UV) (Figura 24).

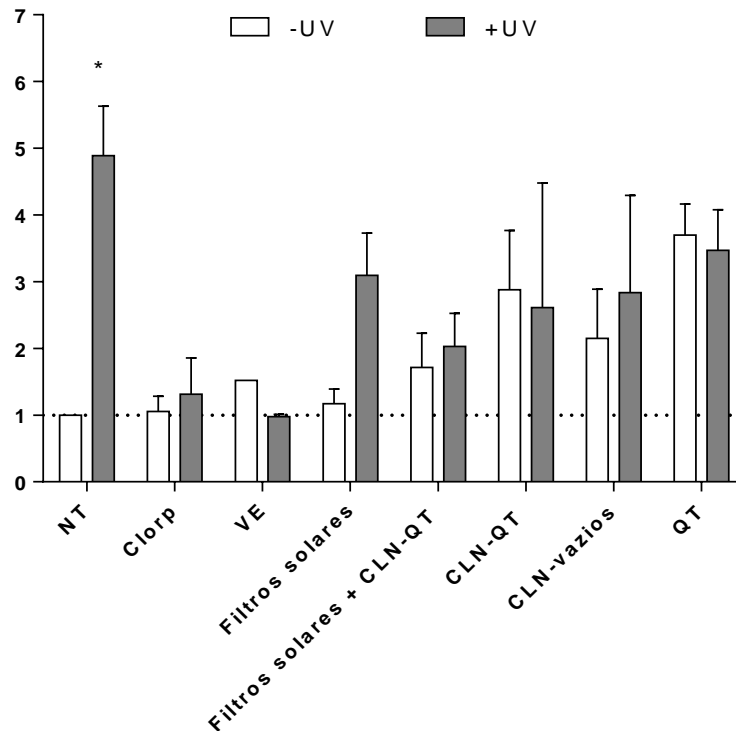
**Figura 24-** Fototoxicidade das substâncias em estudo, após irradiação UVA ( $6\text{J}/\text{cm}^2$ ), utilizando modelo de pele reconstituída. NT: controle não tratado; Clorpr: clorpromazina 0,02%; Filtros solares: MTX e DHHB; Filtros solares + CLN-QT: MTX, DHHB e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; (CLN-QT): carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; CLN-vazios: carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina; QT: quercetina; VE: veículo (óleo de gergelim) (Média e SEM,  $n=3$ ).



### 5.2.5.3. Quantificação da citocina inflamatória IL-6

Os resultados de quantificação da citocina inflamatória IL-6 demonstraram que a radiação UVA ( $6\text{J}/\text{cm}^2$ ) promoveu um aumento estatisticamente significativo da liberação de IL-6 (em torno de cinco vezes) em relação ao controle não tratado (-UV) ( $p<0,05$ ). Por outro lado, todos os tratamentos empregados submetidos à radiação UVA (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) não promoveram mudanças significativas na produção de IL-6, em relação ao controle não tratado (+UV) e em relação aos seus respectivos pares não-irradiados ( $p>0,05$ ) (Figura 25).

**Figura 25-** Liberação de IL-6, após irradiação UVA ( $6 \text{ J/cm}^2$ ), utilizando modelo de pele reconstituída. NT: controle não tratado; Clorp: clorpromazina 0,02%; Filtros solares: MTX e DHHB; Filtros solares + CLN-QT: MTX, DHHB e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; (CLN-QT): carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina; CLN-vazios: carreadores lipídicos nanoestruturados sem quercetina; QT: quercetina; VE: veículo (óleo de gergelim) (Média e SEM, n=3).



### 5.3. Determinação do FPS *in vivo* das formulações contendo CLN-QT associado aos filtros solares

Os resultados do estudo de determinação do FPS *in vivo* demonstraram que as formulações em estudo (F1, F2, F3 e F4) apresentaram valores de FPS na faixa de 16,1 a 17,9, sendo que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14-** Valores obtidos para o FPS *in vivo* das formulações em estudo (n=5, ANOVA). F1: filtros solares; F2: filtros solares + CLN-QT; F3: filtros solares + quercetina livre; F4: filtros solares + CLN-vazios (sem quercetina)

<b>Formulação</b>	<b>FPS <i>in vivo</i> ± DP</b>
F1	16,1 ± 1,97
F2	16,1 ± 1,97
F3	14,9 ± 2,70
F4	17,9 ± 4,00

## **6. DISCUSSÃO**



Atualmente, existem muitas formulações fotoprotetoras capazes de proteger a pele contra os efeitos nocivos da radiação UV (NARAYANAN et al., 2010; SKLAR et al., 2012). No entanto, muitos filtros solares estão sujeitos a reações de fotodegradação, as quais podem levar à perda da capacidade absorptiva da molécula, como também levar a geração de produtos de fotodegradação e EROs (KOCKLER et al., 2012). Conseqüentemente, tem havido uma crescente preocupação acerca da fototoirritação, fotoalergia e fotogenotoxicidade dos filtros solares (NASH; TANNER, 2014).

Além disso, tem-se observado uma forte tendência na utilização de compostos naturais, tais como polifenóis, a fim de melhorar a performance dos filtros solares, e, conseqüentemente reduzir os danos causados pela radiação UV na pele (KAWAKAMI; GASPAR, 2015; MATSUI; 2016). Assim, formulações fotoprotetoras contendo filtros solares e antioxidantes podem ter efeitos fotoprotetores sinérgicos quando comparados a esses agentes utilizados isoladamente (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010; DUPONT et al., 2013; KAWAKAMI; GASPAR, 2015; MATSUI; 2016).

O flavonoide quercetina (QT) apresenta diversas propriedades biológicas, tais como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antialérgicas (VICENTINI et al., 2011; LESJAK et al., 2018; PIVETTA et al., 2019). No entanto, sua limitada absorção percutânea, devido à baixa solubilidade em água, pode reduzir a eficácia como agente fotoprotetor tópico. Portanto, muitas estratégias têm sido utilizadas para melhorar a biodisponibilidade da quercetina, tais como o desenvolvimento de sistemas de liberação (VICENTINI et al., 2008; VICENTINI et al., 2011; HATAHET et al., 2018; PIVETTA et al., 2019).

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

A formulação 1 foi elaborada a base dos filtros solares avobenzona e metoxicinamato de etilexila, já a formulação 2 foi elaborada a base dos filtros solares DHHB e metoxicinamato de etilexila. Ambas as formulações apresentam espectro de absorção muito semelhantes entre si, no entanto, apresentam diferença quanto à fotoestabilidade, uma vez que a formulação F1 contém avobenzona (filtro solar fotoinstável) e a formulação F2 contém DHHB (filtro solar fotoestável). O DHHB foi introduzido no mercado, em 2005, com o propósito de substituir a avobenzona, já que apresenta espectro de absorção no UV muito semelhante a ela, no entanto, com a particularidade de apresentar fotoestabilidade superior (SOBANSKA; BRZEZINSKA, 2011; LHIAUBET-VALLET et al., 2010; KOCKLER et al., 2012).

Já as formulações 3 e 4 foram elaboradas a base dos filtros solares avobenzona, metoxicinamato de etilexila e 3% bemotrizinol (F3) ou 5% bemotrizinol (F4). Pode-se observar que as formulações 3 e 4 apresentam composições semelhante à formulação 1, diferindo apenas na presença do bemotrizinol (filtro solar UVA e UVB). Além de ser considerado um filtro solar de amplo espectro de absorção é também utilizado como fotoestabilizador da avobenzona, reduzindo a ocorrência de reações de degradação dessa molécula (SHAATH, 2010; CHATELAIN; GABARD, 2001). Dessa forma, as formulações 3 e 4 (contendo bemotrizinol) além de apresentarem um espectro de absorção superior às demais formulações, apresentam uma melhora da fotoestabilidade em relação à formulação 1 (que não contém bemotrizinol).

Os estudos de fotoestabilidade foram iniciados com a padronização das condições cromatográficas, as quais foram baseadas em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa e dados da literatura. Diferentes fases móveis foram empregadas a fim de melhorar a resolução dos picos e possibilitar a quantificação simultânea dos mesmos (BENEVENUTO et al., 2015; KAWAKAMI et al., 2017). Os resultados obtidos demonstraram que o método está de acordo com os critérios preconizados pela ANVISA quanto à seletividade, uma vez que o veículo das formulações não apresentou interferência. Foi também considerado adequado quanto aos parâmetros de linearidade ( $r > 0,99$ ), precisão ( $CV < 5\%$ ), e exatidão (80-120%) (BRASIL, 2003).

Os resultados do estudo de fotoestabilidade por CLAE demonstraram que o DHHB e bemotrizinol foram considerados fotoestáveis. Esses resultados estão de acordo com os estudos obtidos da literatura, os quais obtiveram porcentagens remanescentes em torno de 100% para esses filtros solares (KAWAKAMI et al., 2017; BENEVENUTO et al., 2015; LHIAUBET-VALLET et al., 2010).

Por outro lado, o metoxicinamato de etilexila e a avobenzona foram considerados fotoinstáveis. A fotoinstabilidade do metoxicinamato de etilexila pode estar relacionada à fotoisomerização *cis/trans* que este filtro solar está sujeito a sofrer, de forma que o isômero *cis*, formado após a absorção da radiação UVB, apresenta coeficiente de absorvidade molar muito inferior ( $\epsilon = 10.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ao isômero *trans* predominante ( $\epsilon = 19.500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), o que acarreta na redução da absorção UVB (SHAATH, 2010). Já a fotodegradação da avobenzona pode ser atribuída a tautomerização ceto-enólica sofrida por essa molécula após exposição à radiação UV, que resulta na redução da forma enol (absorção máxima em 360 nm) e aumento simultâneo da forma cetona (absorção entre 260 e 280 nm) (LHIAUBET-VALLET, et al., 2010; CHAUDHURI et al., 2017).

Além disso, Herzog et al. (2009) demonstraram que a associação da avobenzona ao metoxicinamato de etilexila em uma formulação fotoprotetora aumentou a fotodegradação deste filtro solar em relação ao seu uso isolado; no entanto, o mesmo efeito não foi observado para a avobenzona. Quando esses dois filtros solares são associados, há uma predominância da reação de cicloadição [2 + 2], a qual é decorrente da interação entre o metoxicinamato de etilexila e a forma enol da avobenzona, em relação à fotoisomerização reversível *cis/trans*. A reação de cicloadição [2 + 2], por sua vez, pode levar à geração de produtos de fotocicloadição e, posteriormente, produtos de fragmentação (HERZOG et al., 2009; KIKUCHI et al., 2013; CHATELAIN; GABARD, 2001). Desta forma, os estudos demonstram que o comportamento fotoquímico de diferentes combinações de filtros solares é mais complexo do que o sugerido pela avaliação dos filtros solares isolados.

Ao analisar a influência das diferentes associações de filtros solares (associações 1, 2, 3 e 4) na fotoestabilidade das substâncias em estudo, foi observado que a substituição da avobenzona pelo DHHB não promoveu melhora da fotoestabilidade do metoxicinamato de etilexila. Foi também observado que o bemotrizinol a 5%, presente na formulação F4, promoveu um aumento significativo da fotoestabilidade do metoxicinamato de etilexila e da avobenzona quando comparada à formulação F1.

Resultados semelhantes também foram demonstrados por Chatelain e Gabard (2001), que relataram melhora da fotoestabilidade tanto do metoxicinamato de etilexila quanto da avobenzona, após a adição de 5% de bemotrizinol. A porcentagem remanescente do metoxicinamato de etilexila descrita por esses autores foi de 35% após irradiação, sendo que a adição de bemotrizinol aumentou esse valor para 65%. Já a porcentagem de remanescente da avobenzona ficou na faixa de 30-44%, sendo que a adição de bemotrizinol aumentou esses valores para 85-95%.

No presente estudo, pode-se sugerir que o aumento da fotoestabilidade da avobenzona pelo bemotrizinol esteja relacionado à capacidade deste filtro solar em agir como um supressor do estado excitado tripleto, atuando como acceptor de energia das moléculas que atingem esse estado excitado e reduzindo desta forma, a ocorrência de reações químicas destrutivas (BENEVENUTO et al., 2015). Além disso, o amplo espectro de absorção no UV do bemotrizinol (280-380 nm), aliado ao seu elevado coeficiente de absorvidade molar no UVA ( $\epsilon = 46.800 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), faz com que ele seja capaz de competir pela absorção de fótons com a avobenzona, diminuindo a probabilidade de ocorrer uma excitação da molécula e, conseqüentemente, reações de fotodegradação (BENEVENUTO et al., 2015; SHAATH, 2010).

Os resultados do estudo de fotoestabilidade por espectrometria no UV demonstraram que as formulações F2 (contendo DHHB e MTX) e F4 (contendo AVO, MTX e BMTZ 5%) foram consideradas fotoestáveis, já as formulações F1 (contendo AVO e MTX) e F3 (contendo AVO, MTX e BMTZ 3%) foram consideradas fotoinstáveis. Tais resultados corroboram com os resultados obtidos por CLAE, uma vez que a fotoinstabilidade das formulações F1 e F3 se devem provavelmente à fotodegradação do metoxicinamato de etilexila e da avobenzona, conforme observado nas análises por CLAE.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a adição de 5% bemotrizinol à associação de avobenzona e metoxicinamato de etilexila (F4) foi considerada vantajosa, uma vez que foi observado aumento da fotoestabilidade desses dois filtros solares nos estudos por CLAE, e da formulação por espectrofotometria no UV. Por fim, a utilização do DHHB (presente na formulação F2) em substituição à avobenzona (presente na formulação F1) é interessante, pois o mesmo foi considerado fotoestável no estudo por CLAE e proporcionou fotoestabilidade à formulação F2, conforme observado no estudo por espectrofotometria no UV.

Os resultados obtidos no estudo de fotorreatividade demonstraram que dentre os filtros solares analisados isoladamente, apenas a avobenzona foi considerada fotorreativa. A fotorreatividade da avobenzona já é descrita na literatura e é atribuída a tautomerização ceto-enólica sofrida por essa molécula após exposição à radiação UV. Após irradiação, o equilíbrio ceto-enólico é deslocado no sentido de formação da forma cetona, que por sua vez, pode absorver fótons, atingir o estado excitado triplete e levar à formação de produtos de degradação. Além disso, pode ocorrer transferência de energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), levando à formação do oxigênio singleto ( $SO$ ). Este pode reagir com a forma enol e levar a formação de produtos de oxidação (LHIAUBEUT-VALLET, 2010; KOCKLER et al., 2012; SHAATH, 2010).

Em relação às associações dos filtros solares em estudo, foi observado que as associações A2 (contendo DHHB e MTX) e A4 (contendo AVO, MTX e BMTZ 5%) foram consideradas não fotorreativas, já as associações A1 (contendo AVO e MTX) e A3 (contendo AVO, MTX e BMTZ 3%) foram consideradas fotorreativas. Desta forma, podemos afirmar que os resultados obtidos no estudo de fotorreatividade corroboram com os resultados do estudo de fotoestabilidade, uma vez que foi observada a capacidade do bemotrizinol em melhorar a fotoestabilidade da avobenzona, quando presente na formulação F4 e diminuir a fotorreatividade da associação A4. Os resultados sugerem que o bemotrizinol agiu como um fotoestabilizador da avobenzona, por meio da neutralização do estado excitado triplete da

mesma. Consequentemente, esse fotoestabilizador impediu/reduziu a ocorrência de reações fotoquímicas, as quais seriam responsáveis pela formação de fotoprodutos e EROs (SHAATH 2010; KOCKLER et al., 2012).

No contexto de avaliação da geração de EROs, a sonda 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA) é frequentemente utilizada. Ela é capaz de detectar EROs intracelulares, tais como o radical hidroxil, o peróxido de hidrogênio e o ânion carbonato. O DCFH<sub>2</sub>-DA pode sofrer reações de hidrólise pelas esterasas celulares formando o composto DCFH, que por sua vez, pode ser convertido pelas EROs no composto 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF), o qual pode ser medido por fluorescência (KALYANARAMAN et al., 2012; ALVES et al., 2016). Uma vez que o ensaio utilizando a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA avalia as EROs formadas em cultura celular e permite a exposição das células à radiação UV, este proporciona resultados biologicamente mais relevantes em relação a outros ensaios, os quais consistem na utilização de radicais livres sintéticos, tais como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) presentes em um meio de reação aquoso/alcoólico.

Os resultados obtidos no estudo de avaliação da geração de EROs por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA demonstraram que dentre os filtros solares analisados isoladamente apenas a avobenzona promoveu um aumento dos níveis de EROs após irradiação. Já em relação as associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) não houve aumento nos níveis de EROs intracelular após irradiação. Os resultados obtidos para a AVO corroboram com os dados obtidos nos estudos de fotoestabilidade e fotorreatividade, uma vez que o aumento da produção de EROs pela irradiação deste filtro solar, pode estar diretamente relacionado à sua fotodegradação e fotorreatividade.

Já os resultados do estudo de fototoxicidade em cultura de fibroblastos (3T3 NRU PT) demonstraram que dentre os filtros solares analisados isoladamente, o DHHB e a avobenzona apresentaram potencial fototóxico. No entanto, não necessariamente apresentarão fototoxicidade *in vivo*. O fato do ensaio 3T3 NRU PT não levar em consideração a penetração cutânea de uma substância, devido à ausência de estrato córneo em cultura celular em monocamadas, pode levar a resultados falsos-positivos (KEJLOVÁ et al., 2007; CERIDONO et al., 2012). Entretanto o teste é bem aceito como primeiro ensaio em uma estratégia de ensaios sequenciais para avaliação de toxicidade, uma vez que não apresenta resultados falso-negativos, o que é fundamental para um ensaio de avaliação de toxicidade (LIEBSCH et al., 2005; JONES et al., 2003; CERIDONO et al., 2012).

Já em relação às associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) todas apresentaram potencial não fototóxico. Desta forma, uma vez que o teste 3T3 NRU PT é geralmente o único ensaio requerido para a determinação da toxicidade aguda de uma substância, quando a mesma não apresenta potencial fototóxico, as quatro associações em estudo (A1, A2, A3 e A4) podem ser consideradas seguras para uso tópico, não sendo necessários testes adicionais para sua comprovação (CERIDONO et al., 2012).

No presente estudo, sugere-se que o AVO sofreu fotodegradação quando presente na formulação F1 (contendo AVO e MTX), o que levou a um aumento da fotorreatividade (geração de oxigênio singlete e ânion superóxido) e geração de EROs intracelular, os quais foram responsáveis por sua fototoxicidade, conforme observado no ensaio 3T3 NRU PT (KAWAKAMI; GASPAR, 2015).

Em relação ao DHHB, ele foi considerado fotoestável na formulação F2 (contendo DHHB e MTX), não fotorreativo (geração de oxigênio singlete e ânion superóxido) e não levou a um aumento de EROs intracelular após a irradiação. No entanto, foi considerado fototóxico no ensaio 3T3 NRU PT (KAWAKAMI et al, 2017). Essas controvérsias podem estar relacionadas à alta sensibilidade dos fibroblastos à radiação UV (ensaio de fototoxicidade) quando comparados aos queratinócitos (EROs intracelular).

Já em relação às associações A1 e A3, apesar delas terem sido consideradas fotoinstáveis e fotorreativas, as mesmas não induziram ao aumento de EROs em cultura celular após irradiação e não foram consideradas fototóxicas no ensaio 3T3 NRU PT. Essas controvérsias podem estar relacionadas às diferentes condições experimentais de cada estudo, tais como, dose de radiação UV, natureza do solvente, substrato utilizado, substância (solução ou formulação) e sistema (biológico ou não biológico). Essas diferentes condições fornecem resultados mais complexos e, portanto, mais difíceis de correlacionar (BESERT et al, 1996; MTURI; MANTINCIGH, 2008; KAWAKAMI et al., 2017).

Além disso, o ensaio de fotorreatividade avalia a geração de EROs em um sistema não-biológico e, portanto, pode superestimar o potencial fototóxico de uma substância, pois não determina a interação direta de substâncias com tecidos biológicos (JaCVAM, 2013; KOJIMA et al., 2018).

Por fim, os resultados das associações A2 (contendo DHHB, MTX) e A4 (contendo AVO, MTX e BMTZ 5%) estão de acordo, já que as mesmas foram consideradas fotoestáveis, não fotorreativas, não levaram ao aumento de EROs intracelular e não apresentaram potencial fototóxico.

A fotogenotoxicidade está relacionada a capacidade de uma substância em causar danos no DNA, por meio da geração de EROs e produtos de fotodegradação, após irradiação (LYNCH et al., 2011; SPIELMANN et al., 2000; BRENDLER-SCHWAB et al., 2004). A avaliação da fotogenotoxicidade é considerada relevante quando uma substância apresenta espectro de absorção no UV/VIS (290-700 nm), alto coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon > 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), fotoinstabilidade, fotorreatividade e potencial fototóxico. Por essa razão, o estudo de fotogenotoxicidade foi realizado somente com a avobenzona, uma vez que ela preenche os requisitos citados acima (GOCKE et al., 2000; LYNCH et al., 2011).

O controle positivo clorpromazina foi considerado fotogenotóxico, o que está de acordo com a literatura (STRUWE et al., 2011; PALUMBO et al., 2016). Sugere-se que o mecanismo de fotossensibilização da clorpromazina ocorra por meio da geração de radicais livres declorinados (sem o cloro), capazes de se ligar covalentemente ao DNA (STRUWE et al., 2007).

Os resultados demonstraram que a avobenzona não foi capaz de causar quebras na fita do DNA, em todas as concentrações estudadas. Alguns estudos demonstraram que a avobenzona não apresentou potencial fotomutagênico pelo teste de Ames e teste com *Saccharomyces cerevisiae* D7 (CHÉTELAT et al., 1993). Além disso, uma petição pública submetida pela *Givaudan-Roure Corporation*, à FDA em 1992, para a inclusão do Parsol 1789 (nome comercial da avobenzona) na lista de ingredientes OTC (“over the counter” – medicamentos de venda livre), demonstrou que a avobenzona não apresentou potencial mutagênico em testes *in vitro* (teste de Ames, teste com *Saccharomyces cerevisiae* D7 e aberração cromossômica com linfócitos humanos) e *in vivo* (FEDERAL REGISTER, 2019).

O ensaio do micronúcleo realizado em camundongos demonstrou que a aplicação oral de 1000, 2500 e 5000 mg/kg de avobenzona não induziu ao aumento de micronúcleos; a avobenzona também não foi considerada fotomutagênica em células CHO-K5 (*Chinese hamster ovary cells*), expostas a diferentes doses de radiação UV (FEDERAL REGISTER, 2019). Além disso, estudos demonstraram que os filtros solares DHHB, MTX e BMTZ não apresentaram potencial fotomutagênico (EUROPEAN COMMISSION, 2008; 2001; PLAUTZ; SALMINEM, 2004). Dessa forma, uma vez que há evidências de que os filtros solares em estudo não apresentam fotogenotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, testes subsequentes não foram realizados no presente projeto.

Conforme descrito anteriormente, a segunda parte do projeto envolveu a avaliação da segurança e eficácia de formulações fotoprotetoras associadas a carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) (PIVETTA et al., 2019). A associação 2 de

filtros solares (contendo DHHB e MTX) foi selecionada para a realização desses estudos, uma vez que os resultados apresentados demonstraram que o uso desta associação é mais vantajoso em relação às outras associações de filtros solares.

Embora a associação A4 (contendo MTX e 5% BMTZ) tenha apresentado resultados semelhantes à associação A2 (contendo DHHB e MTX), optamos por evitar o uso da avobenzona, uma vez que ela foi considerada fotorreativa, fototóxica e induziu aumento de EROs após irradiação, quando analisada isoladamente. Assim, a associação 2 foi selecionada para os testes posteriores.

No presente estudo, incluímos ensaios biológicos complementares à avaliação da fotoestabilidade de filtros solares, tais como, produção de EROs intracelular e fotogenotoxicidade. Foi observado que a complexidade do estudo forneceu informações mais relevantes quando comparado ao estudo de fotoestabilidade realizado de forma isolada. Além disso, a correlação entre a produção de EROs intracelular e a fotorreatividade foi boa, para a AVO e DHHB, uma vez que a AVO foi considerada fotorreativa e aumentou a produção de EROs intracelular e o DHHB foi considerado não-fotorreativo e não aumentou EROs após a irradiação. Assim, sugerimos que o ensaio para avaliação de EROs intracelular seja incluído na estratégia de avaliação da fotoestabilidade.

Os resultados do estudo de citotoxicidade demonstraram que todas as substâncias em estudo (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios, QT) não apresentaram potencial citotóxico, o que está de acordo com os dados obtidos na literatura (SAW et al., 2014; HATAHET et al., 2017).

Os resultados obtidos no estudo da atividade antioxidante, por meio da sonda DCFH<sub>2</sub>-DA mostraram que a associação de filtros solares + CLN-QT proporcionou redução na geração de EROs em comparação ao controle não tratado e em relação a combinação de filtro solares. Além disso, o tratamento com QT também proporcionou redução na produção de EROs, em relação ao controle não tratado (+ UV). Dessa forma, embora os filtros solares isoladamente não tenham apresentado atividade antioxidante após irradiação, esse efeito foi observado quando os mesmos foram associados aos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT).

As propriedades antioxidantes da quercetina, já são bem descritas na literatura, especialmente por sua capacidade de sequestrar os radicais hidroxil, peroxil, ânion superóxido e pela inibição da peroxidação lipídica (CHOI et al., 2003; LIU et al., 2013; CADDEO et al., 2019; LEE et al., 2019). Desta forma, a incorporação dos CLN-QT aos filtros solares é interessante, a fim de se ampliar a fotoproteção, por meio da captura das EROs.



O estudo de fototoxicidade 3T3 NRU PT mostrou que a quercetina (QT) e os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) apresentaram potencial fototóxico. Por outro lado, os filtros solares, filtros solares + CLN-QT e CLN-vazios não apresentaram potencial fototóxico. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, uma vez que a quercetina apresentou potencial fototóxico em diferentes culturas celulares (SVOBODOVÁ et al., 2017; PIVETTA et al., 2019). O seu potencial fototóxico pode estar relacionado à sua capacidade de sofrer degradação após exposição à radiação UVB e UVA, e levar à formação de três produtos de degradação principais, conforme demonstrado por Fahlman e Krol, 2009.

No entanto, a quercetina não necessariamente irá apresentar fototoxicidade *in vivo*, uma vez que a ausência da camada córnea na cultura de fibroblastos acarreta na presença de resultados falsos-positivos (CERIDONO et al., 2012; PIVETTA et al., 2019). Desta forma, a OECD preconiza a realização de outros testes complementares ao teste 3T3 NRU PT para a determinação do potencial fototóxico de uma substância, por meio da definição de estratégias, dentre as quais envolvem o estudo de fototoxicidade em modelo de pele humana reconstituída, seguida pelo estudo em humanos (KANDAROVÁ; LIEBSCH, 2018).

O estudo de fototoxicidade em pele humana reconstituída demonstrou que todas as substâncias em estudo não apresentaram potencial fototóxico, inclusive a quercetina (QT) e os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina (CLN-QT) que anteriormente apresentaram potencial fototóxico no ensaio de 3T3 NRU PT. Desta forma, os testes clínicos para avaliação do potencial fototóxico e fotoalergênico (*photopatch*) podem ser conduzidos. Os resultados negativos para tais testes em humanos indicam que as substâncias podem ser consideradas seguras para uso tópico (GASPAR et al., 2013; LIEBSCH et al., 2005; KEJLOVÁ et al., 2007).

Citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  apresentam um papel importante em processos inflamatórios e danos na pele induzidos pela radiação UV (VICENTINI et al., 2011). No presente estudo foi observado que a radiação UVA induziu aumento de IL-6, quando comparado ao controle não tratado (-UV). No entanto, os tratamentos empregados (filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT) submetidos à radiação UVA não reduziram a produção de IL-6, em relação ao controle não tratado (+UV). Vicentini et al. (2011) demonstraram que o tratamento de queratinócitos humanos primários com quercetina, seguido de radiação UVA/UVB foi efetivo contra o aumento na produção de IL-6.

A ausência de correlação entre os resultados pode estar relacionada às diferenças de radiação, bem como o modelo utilizado (queratinócitos humanos primários e pele humana

reconstituída) e concentração da quercetina aplicada. A presença do estrato córneo no modelo de pele reconstituída, aliado ao baixo poder de penetração da quercetina em sua forma livre podem ter influenciado os resultados e reduzido o efeito anti-inflamatório dessa substância. Isso não foi observado por Vicentini et al. (2011) em cultura de queratinócitos primários, uma vez que a biodisponibilidade da substância é de 100%.

O estudo de determinação do FPS *in vivo* demonstrou que as formulações (F1, F2, F3 e F4) não apresentaram diferenças em relação aos valores de FPS. O valor de FPS reflete a proteção somente contra o eritema (radiação UVB) e, portanto, lesões celulares causadas por EROs podem levar a alterações que, apesar de relevantes, podem ser imperceptíveis a olho nu (LAVKER, 1995). Por outro lado, essas espécies são formadas majoritariamente por meio da indução da radiação UVA (FREITAS et al., 2019). Há relatos na literatura que o surgimento de reações de sensibilização cutânea, dermatites de contato, fototoirritação e fotogenotoxicidade não são levadas em consideração por meio desse parâmetro (SCHUCH et al., 2013; 2014; ONOUE et al., 2017).

Os CLN-QT associados aos filtros solares, apesar de não alterarem o FPS em humanos, reduziram significativamente a geração de EROs intracelular induzidos pela irradiação UVA (cerca de 30%) em relação aos filtros solares isolados. Desta forma, a aplicação tópica dessa associação poderá prevenir os danos oxidativos mediados pelas EROs, e prevenir a longo prazo, efeitos crônicos induzidos pela radiação UV, como o fotoenvelhecimento (MARROT; MEUNIER, 2004). Além disso, os CLN-QT associados aos filtros solares não foram considerados citotóxicos ou fototóxicos nos ensaios de 3T3 NRU PT e no modelo de pele reconstituída e, portanto, sua utilização pode ser considerada vantajosa.

## **7. CONCLUSÕES**

- A associação de filtros solares A2 apresentou melhores resultados quanto à fotoestabilidade e fotorreatividade em relação às associações A1 e A3. Além disso, não aumentou os níveis de EROs intracelular após irradiação UVA e também não foi considerada fototóxica. Portanto, foi associada aos CLN-QT e submetidos aos estudos posteriores.
- A inclusão de ensaios biológicos complementares ao estudo de fotoestabilidade forneceu informações mais relevantes quando comparado ao ensaio de fotodegradação realizado de forma isolada. Além disso, houve correlação entre a produção de EROs intracelular e a fotorreatividade, portanto, sugerimos a inclusão desse ensaio na estratégia de avaliação da fotoestabilidade/fototoxicidade.
- Os filtros solares, filtros solares + CLN-QT, CLN-QT, CLN-vazios e QT não foram considerados citotóxicos. Os filtros solares + CLN-QT e a QT proporcionaram redução na geração de EROs induzidos pela irradiação UVA em relação aos filtros solares isolados.
- A QT e CLN-QT apresentaram potencial fototóxico no ensaio 3T3 NRU PT, entretanto todas as substâncias em estudo foram consideradas não fototóxicas no modelo de pele reconstituída.
- Os resultados de liberação de IL-6 demonstraram que os tratamentos empregados não promoveram redução na produção de IL-6, em relação ao controle não tratado (+UV).
- O estudo de determinação do FPS *in vivo* demonstrou que as formulações (F1, F2, F3 e F4) não apresentaram diferenças em relação aos valores de FPS.
- Os CLN associados aos filtros solares, apesar de não alterarem o FPS em humanos, reduziram significativamente a geração de EROs intracelular induzidos pela irradiação UVA (cerca de 30%) em relação aos filtros solares isolados. Desta forma, a utilização dos filtros solares + CLN-QT é vantajosa, uma vez que podem proporcionar proteção contra os efeitos crônicos induzidos pela radiação UV.

## **8. REFERÊNCIAS**

AFAQ, F. Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, p.144-151, 2011.

ALVES, G.A.D.; SOUZA, R.O.; ROGEZ, H.; MASAKI, H.; FONSECA, M.J. Cecropia obtusa, an Amazonian ethanolic extract, exhibits photochemoprotective effect in vitro and balances the redox cellular state in response to UV radiation. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 893-902, 2016.

AMAR, S. K.; GOYAL, S.; DUBEY, D.; SRIVASTAV, A. K.; CHOPRA, D.; SINGH, J.; SHANKAR, J.; CHATURVEDI, R. K.; RAY, R. S. Benzophenone 1 induced photogenotoxicity and apoptosis via release of cytochrome c and Smac/DIABLO at environmental UV radiation. **Toxicology Letters**, v. 239, p. 182-193, 2015.

ASAHINA, H.; HAN, Z.; KAWANISHI, M.; KATO, T.; AYAKI, H.; TODO, T.; YAGI, T.; TAKEBE, H.; IKENAGA, M.; KIMURA, S.H. Expression of a mammalian DNA photolyase confers light-dependent repair activity and reduces mutation of UV-irradiated shuttle vectors in xeroderma pigmentosum cells. **Mutation Research**, v. 435, p. 255-262, 1999.

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 18, 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 25 set. de 2014.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 31, 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, 19 ago. de 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 69, de 23 de março de 2016. Fica aprovado o Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de março de 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, 4 de jun. 2012a.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília, DF: ANVISA, 2012 (Séries Qualidade em Cosméticos, v.1), 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” anexo. Diário Oficial da União, Brasília, 2 jun. 2003.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; CZICH, A.; EPE, B.; GOCKE, E; KAINA, B.; MULLER, L.; POLLET, D.; UTECH, D. Photochemical genotoxicity: principles and test methods Report of a GUM task force. **Mutation Research**, v. 566, p. 65-91, 2004.

CADDEO, C.; GABRIELE, M.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.; VALENTI, D.; FADDA, A.M; PUCCI, L.; MANCONI, M. Antioxidant activity of quercetin in Eudragit-coated liposomes for intestinal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 565, p. 64-69, 2019.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR, W.A.; DORTA, D.J.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.F. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

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

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

CHAUDHURI, R.K.; OLLENGO, M.A.; SINGH, P.; MARTINCIGH. 3-(3,4,5-Trimethoxybenzylidene)-2,4-pentanedione: Design of a novel photostabilizer with in vivo SPF boosting properties and its use in developing broad-spectrum sunscreen formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, p. 25-35, 2017

CHEN, L.B.A.; HU, J.Y.; WANG, S.T. The role of antioxidant in photoprotection: a critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, p. 1013-1024, 2012.

CHEN-YU, G.; CHUN-FE, Y.; QI-LU, LI.; QI, T.; YAN-WEI, X.; WEI-NA, L.; GUANG-XI, Z. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 292-298, 2012.

CHÉTELAT et al. Photomutagenesis test development: I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and yeast assays. **Mutation Research**, v. 292, p. 241-250, 1993.

CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 482, p. 281-285, 2003.

CORVI, R.; MADIA, F. In vitro genotoxicity testing- Can the performance be enhanced? **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 600-608, 2017.

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

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

European Commission. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, 2018.

European Commission. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on the Evaluation of Potentially Estrogenic Effects of UV-filters adopted by the SCCNFP during the 17th Plenary meeting of 12 June 2001, 2001.

FAHLMAN, B.M.; KROL, E.S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 97, p. 123-131, 2009. Federal Register. Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use, v.84, n.38/ February 26, 2019.

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

FREITAS, J.V.; JUNQUEIRA, H.C.; MARTINS, W.K.; BAPTISTA, M.S.; GASPAR, L.R. Antioxidant role on the protection of melanocytes against visible light-induced photodamage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, p. 399-407, 2019.



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

GALBIATI, V.; MATÍNEZ, V.; BIANCHI, S.; MITJANS, M.; CORSINI, E. Establishment of an in vitro photoallergy test using NCTC2544 cells and IL-18 production. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 103-110, 2013.

GARCÊS, A.; AMARAL, M.H.; SOUSA LOBO, J.M.; SILVA, A.C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 159-167, 2018.

GARINIS, G.A.; JANS, J.; VAN DER HORST, G.T. Photolysis: capturing the light to battle skin cancer. **Future Oncology**, v. 2, p. 191-199, 2006.

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

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

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

GASPAR, Lorena Rigo; KAWAKAMI, Camila Martins; BENEVENUTO, Carolina Gomes. In: Overview on the current status of available test methods and additional promising methods for assessing UV-induced effect, Alternatives for dermal toxicity testing, Switzerland, Springer, 2018, 463-476.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on Photoprotection. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 101, p. 659–672, 2010.

GOCKE, E.; MULLER, L.; GUZZIE, P.J; BRENDLER-SCHAAB, S.; BULERA, S.; CHIGNEL, C.F.; HENDERSON, L.M.; JACOBS, A.; MURLI, H.; SNYDER, R.D.; TANAKA, N. Considerations on Photochemical Genotoxicity: Report of the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Working Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 173-184, 2000.

GRUBER, F.P.; HARTUNG, T. Alternatives to Animal Experimentation in Basic Research. **ALTEX**, v. 1-31, 2004.

HATAHET, T.; MORILLE, M.; HOMMOSS, A.; DEVOISSELE, J.M.; MULLER, R.H.; BÉGU, S. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 41-53, 2016.

HATAHET, T.; MORILLE, M.; HOMMOSS, A.; DEVOISSELE, J.M.; MULLER, R.H.; BÉGU, S. Liposomes, lipid nanocapsules and smart Crystals®: A comparative study for an

effective quercetin delivery to the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, p. 176-185, 2018.

HATAHET, T.; MORILLE, M.; SHAMSEDDIN, A.; AUBERT-POUESSEL, A.; DEVOISSELLE, J.M.; BÉGU, S. Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, p. 167-176, 2017.

HERZOG, B.; WEHRLE, M.; QUASS, K. Photostability of UV Absorber Systems in Sunscreens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 869-878, 2009.

HIBLER, Brian; DUSZA, Stephen; WANG, Steven. In: Photoprotection and Skin Cancer Prevention, Principles and Practice of Photoprotection, Switzerland, Springer, 2016, p. 23-38.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2018.

ISO 24444 *Sun Protection Test Methods – in vivo Determination of Sun Protection Factor (SPF)*, 2010.

JACVAM. Reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals. ROS Assay Protocol, ROS assay Validation Management Team, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, 2013. [http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_protocol\\_v3.1\\_130920\\_clean.pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean.pdf) (acessado em 20.01.2015).

JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S.Q.; BURNETT, M.; LIM, H.W. Photoprotection. Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, p. 1-14, 2013.

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

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

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K.J.A.; DENNERY, P.A.; FORMAN H.J.; GRISHAM, M.B.; MANN, G.E.; MOORE, K.; ROBERTS, J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, 2012.

KANDAROVÁ, Helena; LIEBSCH, Manfred, 2018. The EpiDerm<sup>TM</sup> Phototoxicity Test (EpiDerm<sup>TM</sup> H3D-PT), Alternatives for dermal toxicity testing, Switzerland, Springer, 2018, 483-506.

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

KARUPPAGOUNDER, V.; ARUMUGAM, S.; THANDAVARAYAN, R.A.; SREEDHAR, R.; GIRIDHARAN, V.V.; WATANABE, K. Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 631-639, 2016.

KAWAKAMI, C.M.; GASPAR, L.R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 239-247, 2015.

KAWAKAMI, C.M.; MÁXIMO, L.N.C.; FONTANEZI, B.B.; SILVA, R.S.; GASPAR, L.R. Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB) as additive to the UV filter avobenzone in cosmetic sunscreen formulations - Evaluation of the photochemical behavior and photostabilizing effect. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 299-309, 2017.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; BENDO VÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁROVÁ, H.; LIEBSCH, M. 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, 2007.

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

KIRKLAND, D.; PFUHLER, S.; TWEATS, D.; AARDERMA, M.; CORVI, R.; DARROUDI, F.; ELHAJOUJI, A.; GLATT, H.; HASTWELL, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRCHNER, S.; LYNCH, A.; MARZIN, D.; MAURICI, D.; MEUNIER, J.R.; MULLER, L.; NOHYNEK, G.; PARRY, J.; PARRY, E.; THYBAUD, V.; TICE, R.; BENTHEM, J.V.; VANPARYS, P.; WHITE, P. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation Research**, v. 628, p. 31-55, 2007.

KIRKLAND, D.J., HENDERSON, L., MARZIN, D., MULLER, L., PARRY, J.M., SPEIT, G., TWEATS, D.J., WILLIAMS, G.M., 2005b. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. **Mutation Research**, v. 588, p. 88-105, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDIER, I.; ELHAJOUJI, A.; PLAS, G.; AARDERMA, M.; FENECH, M. *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. **Mutagenesis**, v. 26, p. 177-184, 2011.

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

KOJIMA, Hajime; HOSOI, Kazuhiro; ONOUE, Satomi. Reactive Oxygen Species Assay for Evaluating Phototoxicity Potential, Alternatives for dermal toxicity testing, Switzerland, Springer, 2018, 477-482.

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

LEE, C.G. The animal welfare act as a fifty problems and possibilities in animal testing regulation. *Nebraska law review*, Forthcoming, 2016.

LEE, K.S.; PARK, S.N. Cytoprotective effects and mechanisms of quercetin, quercitrin and avicularin isolated from *Lespedeza cuneata* G. Don against ROS-induced cellular damage. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 71, p. 160-166, 2019.

LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAC, D.; MAJKIC, T.; BEKVALAC, K.; ORCIC, D.; MIMICA-DUKIC, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.

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

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

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

LIU, D.; HU, H.; LIN, Z.; CHEN, D.; ZHU, Y.; HOU, S.; SHI. Quercetin deformable liposome: Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 8-17, 2013.

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

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

LYNCH, A.M; GUZZIE, P.J.; BAUER, D.; GOCKE, E.; ITOH, S.; JABOBS, A.; KRUL, C.A.M; SCHEPKY, A.; TANAKA, N.; KASPER, P. Considerations on photochemical genotoxicity. II: Report of the 2009 International Workshop on Genotoxicity Testing Working Group. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, p. 91-100, 2011.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 6, p. 1-7, 2009.

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

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, p. 139-148, 2008.

MATSUI, Mary. The Role of Topical Antioxidants in Photoprotection, Principles and Practice of Photoprotection, Switzerland, Springer, 2016, p. 361-375.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

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, p. 410-420, 2008.

NAGULA, R.L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 296, p. 190-201, 2019.

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

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, p. 305-313, 2015.

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

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

OECD, 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test n° 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test (Original Guideline, adopted 13th April 2004) <<http://www.oecd.org/>>.

OECD, 2019. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test n° 495: Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity <<http://www.oecd.org/>>.

ONOUÉ, S.; HOSOI, K.; WAKURI, S.; IWASE, Y.; YAMAMOTO, T.; MATSUOKA, N.; NAKAMURA, K.; TODA, T.; TAKAGI, H.; OSAKI, N.; MATSUMOTO, Y.; KAWAKAMI, S.; SETO, Y.; KATO, M.; YAMADA, S.; OHNO, Y.; KOJIMA, H. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standart protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 1241-1250, 2013.

ONOUÉ, S.; SETO, Y.; SATO, H.; NISHIDA, H.; HIROTA, M.; ASHIKAGA, T.; API, A.M.; BASKETTER, D.; TOKURA, Y. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, p. 4-11, 2017.

OSTERWALDER, U.; SOHN, M.; HERZOG, B. Global state of sunscreens. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 30, p. 62-80, 2014.

PALUMBO, F.; GARCIA-LAINEZ, G.; LIMONES-HERRERO, D.; COLOMA, M.D.; ESCOBAR, J.; JIMÉNEZ, M.C.; MIRANDA, M.; ANDREU, I. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 313, p. 131-137, 2016.

PENNACCHI, P.C., ALMEIDA, M.E.S., GOMES, A.L.A., FAIÃO-FLORES, F., CREPALDI, M.C.A., SANTOS, M.F., BARROS, S.B.M., MARIA-ENGLER, S.S. Glycated reconstructed human skin as a platform to study the pathogenesis of skin aging. **Tissue Engineering: Part A**, v. 21, p. 2417-2425, 2015.

PFUHLER, S.; KIRST, A.; AARDERMA, M.; BANDUHN, N.; GOEBEL, C.; ARAKI, D.; COSTABEL-FARKAS, M.; DUFOUR, E.; HARVEY, J.; HEWITT, N.; HIBATALLAH, J.; CARMICHAEL, P.; MACFARLANE, M.; REISINGER, K.; ROWLAND, J.; SCHELLAUF, F.; SCHEPKY, A.; SCHEEL, J. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Genotoxicity. A COLIPA analysis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 315-324, 2010.

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

PIVETTA, T.P.; SILVA, L.B.; KAWAKAMI, C.M.; ARAÚJO, M.M.; DEL LAMA, M.P.F.M.; NAAL, R.M.Z.G.; MARIA-ENGLER, S.S.; GASPAR, L.R.; MARCATO, P.D. Topical formulation of quercetin encapsulated in natural lipid nanocarriers: Evaluation of biological properties and phototoxic effect. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, 101148, 2019.

PLAUTZ, J.R.; SALMINEM, W.F. Safety of Tinosorb S, a new organic sunscreen for broad spectrum UV protection. **Toxicologist**, v. 78 (1-S):159, 2004.

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

REISINGER, K.; BLATS, V.; BRINKMANN, J.; DOWNS, T.R.; FISCHER, A.; HENKLER, F.; HOFFMANN, S.; KRUL, C.; LIEBSCH, M.; LUCH, A.; PIROW, R.; REUS, A.A.; SCHULZ, M.; PFUHLER, S. Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 827, p. 27-41, 2018.

ROGERIO, A.P.; DORA, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVES, J.S.; SILVA, L.F.C.; LEMOS-SENNA, E.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 288-297, 2010.

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

SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748-758, 2011.

SARGENT, E.V.; TRAVERS, J.B. Examining the differences in current regulatory processes for sunscreens and proposed safety assessment paradigm. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 79, p. 125-141, 2016.

SAW, C.L.L.; GUO, Y.; YANG, A.Y.; PAREDES-GONZALEZ, X.; RAMIREZ, C.; PUNG, D.; KONG, A.N.T. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 303-311, 2014.

SCHUCH, A.P.; GARCIA, C.C.M.; MAKITA, K.; MENCK, C.F.M. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 12, p. 1259-1272, 2013.

SCHUCH, A.P.; MORAES, M.C.S.; YAGURA, T.; MENCK, C.F.M. Highly sensitive biological assay for determining the photoprotective efficacy of sunscreen. **Environmental Science and Technology**, v. 48, p. 11584-11590, 2014.

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

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

SHAATH, Nadim. In: *The Chemistry of Ultraviolet Filters, Principles and Practice of Photoprotection*, Switzerland, Springer, 2016, p. 143-157.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.Y.; TICE, R.R.; SCHENEIDER, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

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**, v. 12, p. 54-64, 2013.

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

SOHN, Myriam. In: *UV Booster and Photoprotection, Principles and Practice of Photoprotection*, Switzerland, Springer, 2016, p. 227-245.

SPIELMANN H.; MULLER, L.; AVERBECH, D.; BALLS, M.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; CASTELL, J. V.; CURREN, R.; DE SILVA, O.; GIBBS, N. K.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W. W.; MERCK, H. F.; NASH, J. F.; NEUMANN, N. J.; PAPE, W. J. W.; ULRICH, P.; VOHR, H. W. The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing. **Alternative to Laboratorial Animals**, v. 28, p. 777-814, 2000.

STRUWE, M.; CSATO, M.; SINGER, T.; GOCKE, E. Comprehensive assessment of the photomutagenicity, photogenotoxicity and photo(cyto)toxicity of azulene. **Mutation Research**, v. 723, p. 129-133, 2011.

STRUWE, M.; GREULICH, K.O.; STER, W.; PLAPPERT-HELBIG, U. The photo comet assay—A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity *in vitro*. **Mutation Research**, v.632, p.44-57, 2007.

SVOBODOVÁ, A.R.; RYSAVA, A.; PSOTOVÁ, M.; KOSINA, P.; ZALESÁK, B.; ULRICHOVÁ, J.; VOSTALOVÁ, J. The Phototoxic Potential of the Flavonoids, Taxifolin and Quercetin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p. 1240–1247, 2017.

TEDESCO A.C.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous. **Brazilian Journal of Biomedical Research**, v. 30, p. 561-575, 1997.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VICENTINI, F.T.M.C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M.J.; VERRY JR, W.A.; FISHER, G.J.; XU, Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-κB pathway. **Journal of Dermatological Sciences**, v. 61, p. 162-168, 2011.

VICENTINI, F.T.M.C.; SIMI, T.R.M.; DEL CIAMPO, J.O.; WOLGA, N.O.; PITOL, D.L.; IYOMASA, M.M.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 948–957, 2008.

VINARDELL, M.P. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on consumer safety (SCCS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, p. 198-204, 2015.

VIOUX-CHAGNOLEAU, C.; LEJEUNE, F.; SOK, J. Reconstructed human skin: from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Sciences**, v. 2, S1-S12, 2006.

WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; YANG, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 21-38, 2016.



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

YEAGER, D.G.; LIM, H.W. What's New in Photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 37, p. 149-157, 2019.

YOUNG, A.R.; CLAVEAU, J.; ROSSE, A.B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n.3, p. 100-109, 2016.

# **ANEXOS**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
*Comitê de Ética em Pesquisa*

Of. CEP/FCFRP nº. 021/2017  
kms

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2017.

À  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro**  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS EM PELE HUMANA RECONSTITUÍDA: EFEITO DA FOTOESTABILIDADE EM MARCADORES LIGADOS AO FOTOENVELHECIMENTO E CÂNCER DE PELE", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 397 - CAAE nº 51712415.4.0000.5403, foi aprovado *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 22/02/2016, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 1.420.421. Informamos ainda que a emenda 1 do referido projeto foi aprovada *ad referendum* do CEP em 19/08/2016, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 1.686.543.

Lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO  
Coordenadora do CEP/FCFRP



Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2019.

À  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro/ Camila Martins Kawakami  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa “DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) DOS PRODUTOS F1 (DES-0797), F2 (DES-0798), F3 (DES-0799) E F4 (DES-0800)”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/ Allergisa nº. 397 – CAAE nº 16377419.5.0000.5599, foi aprovado ad referendum do Comitê de Ética em Pesquisa da Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética LTDA em 17/06/2019, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.448.417.

Atenciosamente,

---

Lucas Offenbecker Guerra

Pesquisador Responsável

