



**Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica**

DANIELA CRISTINA VINHAL

**Planejamento, Síntese, Caracterização e Avaliação Toxicológica
de um Novo Composto Candidato a Protótipo de Fotoprotetor
Orgânico – LQFM184**

**Goiânia
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: **Daniela Cistina Vinhal**

Título do trabalho: **Planejamento, Síntese, Caracterização e Avaliação Toxicológica de um Novo Composto Candidato a Protótipo de Fotoprotetor Orgânico – LQFM184**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 13/10/2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

DANIELA CRISTINA VINHAL

**Planejamento, Síntese, Caracterização e Avaliação Toxicológica
de um Novo Composto Candidato a Protótipo de Fotoprotetor
Orgânico – LQFM184**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Menegatti

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do programa de geração automática do sistema de bibliotecas da ufg.

Vinhal, Daniela Cristina

Planejamento, Síntese, Caracterização e Avaliação Toxicológica de um Novo Composto Candidato a Protótipo de Fotoprotetor Orgânico – LQFM184 [manuscrito] / Daniela Cristina Vinhal. - 2016. CXL, 140 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha; co-orientador Dr. Ricardo Menegatti.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Câncer de pele. 2. Radiação ultravioleta. 3. Filtro solar. 4. Triazina. 5. LQFM184. I. Cunha, Luiz Carlos da, orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA

ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE

Aluno (a): Daniela Cristina Vinhal

Orientador (a): Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Título da Dissertação: "Planejamento, Síntese, Caracterização e Avaliação Toxicológica de um Novo Composto Candidato a Protótipo de Fotoprotetor Orgânico".

Data: 30 de setembro de 2016

Horário: 08:00 horas

Local: Mini Auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

A banca examinadora fez sugestões de ajuste no texto, que deverão ser efetivadas.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	<i>Luiz Carlos</i>
Prof. Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro (UNB)	Aprovado	<i>Luiz</i>
Prof. Dr. Pablo José Gonçalves (IF/UFG)	Aprovado	<i>Pablo</i>
Profª. Drª. Danielle Guimarães Almeida Diniz (FF/UFG)	Aprovada	<i>Danielle</i>
Prof. Dr. James Oluwagbamigbe Fajemiroye (FF/UFG)	Aprovado	<i>James</i>
Prof. Dr. Flávio Silva de Carvalho (IQ/UFG) - Suplente	Aprovado	<i>Flávio</i>
Profª. Drª. Michelle Pereira Quintino (PUC/GO) - Suplente		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	
	<i>Aprovado</i>	

“Ninguém engane a si mesmo: se alguém dentre vós se tem por sábio neste mundo, faça-se louco para ser sábio”.

Coríntios: 3,18.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha do Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológicas (NEPET) da Faculdade de Farmácia – UFG pela orientação e pela oportunidade de realização deste projeto;
- Ao Prof. Dr. Ricardo Menegatti do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia – UFG pela coorientação, disponibilidade e receptividade;
- Ao Prof. Dr. Luciano Moraes Lião e sua Equipe do Laboratório de RMN do Instituto de Química – UFG pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio unidimensional e bidimensional;
- Ao Técnico Rangel Magalhães Luzin, responsável pela Central Analítica do Instituto de Química – UFG onde foram realizados os testes de análise térmica e infravermelho;
- Ao Prof. Dr. Boniek da Silva Vaz e sua aluna de mestrado Gêssica Vasconcelos Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pela realização das análises em espectroscopia de massas;
- Ao Prof. Dr. Pablo José Gonçalves e seu aluno de mestrado Rogério Jorge do Instituto de Física – UFG pela disponibilização nas análises de espectroscopia de fluorescência;
- Ao Dr. Stephen Benjamin do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Farmácia – UFG pela realização dos testes em voltametria cíclica;
- À Profa. Dra. Marize Campos e ao doutorando Renato Ivan Ávila do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC) da Faculdade de Farmácia – UFG pela contribuição e disponibilidade para realização dos ensaios de toxicidade *in vitro*;
- A minha família, ao meu esposo e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.
- E, desde já, à banca examinadora por aceitar o convite, pelas críticas e quaisquer contribuições que possam prestar.

RESUMO

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 apontam para a ocorrência de, aproximadamente, 596 mil casos novos de câncer de pele, sendo em sua maioria relacionados com a exposição à radiação ultravioleta. Segundo consenso atual, tais danos podem ser minimizados através do uso profilático de protetores solares. Neste sentido, o presente trabalho propôs o planejamento, a síntese, a caracterização estrutural e a avaliação toxicológica de um novo composto candidato a fotoprotetor orgânico, o LQFM184 (**20**). O planejamento estrutural baseou-se tanto na semelhança molecular quanto na ação química de derivados triazínicos (**10**, **11** e **13**), cinâmicos (**4**) e do LQFM048 (**14**), tendo como partida o composto (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**) que foi produzido a partir da vanilina. O composto LQFM184 (**20**) apresentou peso molecular de 729,65 Daltons e a rota sintética proposta constituiu-se por três etapas com rendimento global de 53%, das quais foram realizadas sob o âmbito da química verde. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados através das técnicas de ressonância magnética nuclear, infravermelho, massas, ultravioleta e fluorescência. O composto LQFM184 (**20**) apresentou dois picos de absorção máxima ($\lambda_{m\acute{a}x.}$), sendo 298 nm na região da UVB e 334 nm na UVA, além de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) acima de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Quanto à voltametria cíclica o composto LQFM184 (**20**) manteve-se estável frente aos potenciais aplicados e quando exposto à atmosfera de ar sintético apresentou uma perda de massa de ~14% na faixa de 254°C, caracterizando-o estável sob temperaturas elevadas, visto que seu ponto de fusão ocorre em 147°C. A partir da avaliação *in vitro* pelo método espectrofotométrico descrito por Mansur o mesmo apresentou Fator de Proteção Solar (FPS) igual a 3,69 para a UVB. Além disso, o composto não promove irritação ocular ou lesões oculares graves quando em contato com células de córnea de coelho SIRC e foi classificado na categoria 4 do sistema GHS conforme OECD 423, de baixa toxicidade. Ao término deste trabalho podemos observar que a rota sintética proposta para a obtenção do composto LQFM184 (**20**) se mostrou eficaz, face aos altos rendimentos obtidos, etapas pouco laboriosas e de baixo custo, bem como promissor perfil fotoprotetor.

Palavras-chave: Câncer de pele. Radiação ultravioleta. Absorbância. Filtro solar. Triazina. LQFM184.

ABSTRACT

In Brazil, the estimates for the year 2016 point to approximately 596,000 new cases of skin cancer, being mostly related to exposure to ultraviolet radiation. According to current consensus, such damage can be minimized by prophylactic use of sunscreens. This way, this study proposes the planning, synthesis, structural characterization and toxicological assessment of a new candidate compound to organic sunscreen, LQFM184 (**20**). The structural planning was based both on molecular similarity in chemical action triazine derivatives (**10**, **11** and **13**), cinnamic (**4**) and LQFM048 (**14**), with the starting compound (*E*)-2-cyano-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide (**18**) which was produced from vanillin. In addition, LQFM184 (**20**) compound has molecular weight 729.65 Daltons and the synthetic route proposal consisted of two stages, 53% overall yield, which were performed under the scope of green chemistry. All the synthesized compounds were characterized by techniques of nuclear magnetic resonance, infrared, mass, ultraviolet and fluorescence. From the spectrophotometric absorption technique it was identified that LQFM184 (**20**) compound had two peaks of maximum absorption ($\lambda_{max.}$) 306 nm in the region of UVB and 344 nm for UVA and molar absorptivity (ϵ) whose values were above $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As to the technique of cyclic voltammetry LQFM184 (**20**) compound was stable considering the applied potential and when under an atmosphere of synthetic air showed a weight loss of ~14% in the range of 250°C, characterized as a stable compound at high temperatures. From the *in vitro* evaluation by the spectrophotometric method described by Mansur it presented Solar Protection Factor (SPF) equal to 3.69 for the UVB. Moreover, the compound does not promote irritation or serious damage when in contact with rabbit cornea cells SIRC and was classified in category 4 of the GHS system as OECD 423, low toxicity. At the end of this work it is possible to observe that the proposed synthetic route to obtain the LQFM184 (**20**) compound was effective, given the obtained high yields, laborious and low cost steps as well as promising profile sunscreen.

Keywords: Skin cancer. Ultraviolet radiation. Absorbance. Sunscreen. Triazine. LQFM184.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro solar <i>versus</i> penetração cutânea.....	05
Figura 2 - Camadas da pele e estrutura da epiderme.....	06
Figura 3 - Estrutura química do ácido urocânico ou ácido 4-imidazoilacrílico (1)....	07
Figura 4 - Disposição dos orbitais moleculares para as três configurações eletrônicas do oxigênio molecular (O ₂).....	08
Figura 5 - Desenvolvimento das reações fotoquímicas.....	09
Figura 6 - Estrutura química dos isômeros de absorção dos filtros UV.....	15
Figura 7 - Transições eletrônicas entre os orbitais HOMO-LUMO.....	16
Figura 8 - Diagrama de Jablonski.....	16
Figura 9 - Esquema do deslocamento de elétrons em um filtro orgânico (ex.: PABA) após absorção da radiação UV. (A): PABA simplificado; (B): Estrutura do Benzeno com grupo doador de elétrons. (C): Estrutura do Benzeno com grupo acceptor de elétrons.....	17
Figura 10 - Alteração estrutural no PABA.....	18
Figura 11 - Fotoisomerização do <i>para</i> -metoxicinamato de octila (4).....	18
Figura 12 - Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona (6).....	19
Figura 13 - Degradação da avobenzona (6) em radical fenacil e benzoil.....	19
Figura 14 - Estrutura química do filtro solar orgânico tris-bifenil triazina (12).....	30
Figura 15 - Ciclo de conversão da energia UV em calor (cerca de 10 ⁻¹² segundos), representando o modelo de proteção UV por absorção.....	31
Figura 16 - Estrutura química do filtro solar orgânico etilexil triazona (Uvinul T150®) (13).....	32
Figura 17 - Estrutura química do composto LQFM048 (14).....	33
Figura 18 - Planejamento estrutural do composto LQFM184 (20) a partir da análise retrossintética do composto comercial Uvinul T150® (13).....	34
Figura 19 - Bioisosterismo de anéis entre os compostos LQFM048 (14) (A) e (E)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18) (B).....	37
Figura 20 - Reação de obtenção do composto 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (17).....	38

Figura 21 - Reação de obtenção do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18).....	39
Figura 22 - Reação de obtenção do composto 2,4,6-tris((<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida)-1,3,5-triazina - LQFM184 (20).....	40
Figura 23 - Microplaca de 96 poços semeada com células 3T3 para o teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> do LQFM184 (20) nas concentrações de 1,6; 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL. O LQFM184 (20) foi solubilizado totalmente em DMSO e as diluições foram feitas em DMEM suplementado com 10% de SFB. DMSO 0,12% (veículo) também foi exposto às células do controle.....	49
Figura 24 - Estrutura molecular do composto candidato a protótipo fotoprotetor LQFM184 (20) com indicação da polarização das transições com consequente absorção na região da UVA e UVB.....	50
Figura 25 - Análise retrossintética de obtenção do composto LQFM184 (20).....	51
Figura 26 - Mecanismo de formação do composto 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (17).....	53
Figura 27 - Mecanismo de formação do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18).....	54
Figura 28 - Mecanismo de formação do composto 2,4,6-tris((<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida)-1,3,5-triazina - LQFM184 (20).....	55
Figura 29 - Rota sintética e rendimento global.....	57
Figura 30 - Sobreposição dos espectros de RMN de ¹ H unidimensional dos compostos 17 , 18 e LQFM184 (20), respectivamente.....	59
Figura 31 - Espectro de ¹³ C do composto LQFM184 (20) com destaque para o carbono da posição 1'' do anel triazínico.....	61
Figura 32 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 17	63
Figura 33 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto 18	64
Figura 34 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto LQFM184 (20).....	65
Figura 35 - Espectro de massas do composto 17	66
Figura 36 - Espectro de massas do composto 18	66
Figura 37 - Espectro de massas do composto LQFM184 (20).....	67

Figura 38 - Espectro de absorção no ultravioleta para o composto 17 com varreduras em variadas concentrações utilizando clorofórmio como solvente.....	68
Figura 39 - Espectro de absorção no ultravioleta para o composto 18 com varreduras em variadas concentrações utilizando DMSO como solvente.....	68
Figura 40 - Espectro de absorção no ultravioleta para o composto LQFM184 (20) com varreduras em variadas concentrações utilizando DMSO como solvente.....	69
Figura 41 - Curva de calibração utilizada no cálculo do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para o composto LQFM184 (20) utilizando DMSO como solvente.....	70
Figura 42 - Espectro de fluorescência para o composto 17 submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando clorofórmio como solvente.....	72
Figura 43 - Espectro de fluorescência para o composto 18 submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando DMSO como solvente.....	73
Figura 44 - Espectro de fluorescência para o composto LQFM184 (20) submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando DMSO como solvente.....	74
Figura 45 - Voltamograma cíclico comparativo entre amostras dos compostos 17 , 18 e LQFM184 (20). Tampão Fosfato 0,1 M, pH 5,0. Faixa de varredura -0,25 a 1,25 V. Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	75
Figura 46 - Curva de TG em função do tempo e temperatura do composto LQFM184 (20) submetido à atmosfera de ar sintético.....	76
Figura 47 - Espectro de absorção no ultravioleta para o <i>para</i> -metoxicinamato de octila (4), utilizado como padrão, utilizando DMSO como solvente.....	77
Figura 48 - Varredura em triplicata para o espectro de absorção no ultravioleta do LQFM184 (20), utilizando DMSO como solvente.....	78
Figura 49 - Classificação da toxicidade oral aguda iniciando com a dose de 2000 mg/Kg conforme OECD 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001.....	81
Figura 50 - Avaliação da citotoxicidade basal <i>in vitro</i> do LQFM184 (20) em células 3T3. As células foram expostas a diferentes concentrações da substância-teste (1,6-200 μ g/mL) e, após 48 h, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de captação do vermelho neutro.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e características da radiação solar não ionizante.....	03
Tabela 2 - Subdivisões da radiação UV.....	04
Tabela 3 - Classificação dos filtros solares orgânicos.....	13
Tabela 4 - Classificação dos fototipos cutâneos a partir da escala Fitzpatrick.....	21
Tabela 5 - Influência da quantidade aplicada de filtro solar no FPUVB.....	23
Tabela 6 - Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação UVB em cada comprimento de onda.....	25
Tabela 7 - Grau de proteção UVA a ser declarado na embalagem de fotoprotetores.....	26
Tabela 8 - Designação de Categoria de Proteção (DCP) relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos protetores solares.....	28
Tabela 9 - Modelo de predição de irritação ocular pelo ensaio STE conforme OECD 491.....	47
Tabela 10 - Atribuição dos átomos de hidrogênios e carbonos para os compostos 17 , 18 e LQFM184 (20), através de RMN ¹ H unidimensional e ¹ H e ¹³ C bidimensional.....	58
Tabela 11 - Principais frequências de absorção no infravermelho para os compostos 17 , 18 e LQFM184 (20).....	62
Tabela 12 - Comprimento de onda <i>versus</i> absorbância média para as amostras com solução padrão de <i>para</i> -metoxicinamato de octila (4) em concentração teórica de $1,2 \times 10^{-5}$ M, utilizando DMSO como solvente.....	78
Tabela 13 - Comprimento de onda <i>versus</i> absorbância média para as amostras com solução do composto 20 em concentração teórica de $1,3 \times 10^{-5}$ M, utilizando DMSO como solvente.....	79
Tabela 14 - Resultados do ensaio de STE para o composto LQFM184 (20).....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singlete

Abs - Absorbância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEMT - Bis-Etilhexiloxifenol Metoxifenil Triazina

COLIPA - *European Trade Association Representing Cosmetic Industry*

CTFA-AS - *Cosmetics, Toiletries and Fragrance Association*

Daltons - Da

DME – Dose Mínima Eritematógena

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

EM – Espectrometria de Massas

ESI-EM - Espectrometria de Massas através de ionização por *electrospray*

EUA – Estados Unidos da América

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA - *Food and Drug Administration*

FPS – Fator de Proteção Solar

FPUVA - Fator de Proteção contra a Radiação Ultravioleta A

FPUVB – Fator de Proteção contra a Radiação Ultravioleta B

HBzTs - Hidroxi-Fenil-Benzotriazóis

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HOMO - *High Occuped Molecular Orbital*

HPTs - Hidroxi-Fenil-Triazinas

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz - Hertz

i.e. – isto é

IPD - *Immediate Pigment Darkening*

IV – Infravermelho

J - Constante de Acoplamento

JCIA - *Japan Cosmetic Industry Association*

Js – Joule x segundo

KBr - Brometo de Potássio

KJ - Quilojoules

LUMO - *Low Unoccupied Molecular Orbital*

MBBT - Metileno-Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenol

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul

mmol - milimol

nm – nanômetros

OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*

OTC - *Over The Counter*

P.A. – Puro para Análise

P.F. - Ponto de Fusão

P.M. - Peso Molecular

PABA - Ácido *para*-Aminobenzóico

PPD - *Persistent Pigment Darkening*

R.f. - Fator de Retenção

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ¹³C.

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ¹H.

s - segundos

SBD - Sociedade Brasileira de Dermatologia

SIRC - *Seruminstitut Rabbit Cornea*

STE - *Short Time Exposure*

t.a. – Temperatura ambiente
TEA – *Time and Material Extent Application*
TGA - *Therapeutic Goods Act*
UN GHS - *United Nations Globally Harmonized System for Classification*
UV – Ultravioleta
UVA – Radiação Ultravioleta A
UVB – Radiação Ultravioleta B
UVC – Radiação Ultravioleta C
UV-Vis – Ultravioleta – Visível
 ν - Frequência
v/v – volume/volume
Vis – Visível
W - Watts
 ϵ – Coeficiente de absorvidade molar
 λ – Comprimento de onda
 λ_c – Comprimento de onda crítico
 $\lambda_{máx.}$ - Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
2.1 PELE X RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	03
2.1.1 O Espectro Solar.....	03
2.1.2 Fotocarcinogênese.....	05
2.1.3 Impacto Sócio-Econômico do Câncer de Pele.....	10
2.2 FILTROS SOLARES.....	11
2.2.1 Filtros Inorgânicos.....	12
2.2.2 Filtros Orgânicos.....	13
2.2.3 Fator de Proteção Solar (FPS).....	20
2.2.3.1 Fator de Proteção UVB (FPUVB).....	21
2.2.3.2 Fator de Proteção UVA (FPUVA).....	25
2.2.4 Produtos Fotoprotetores.....	27
2.2.5 Fotoprotetores Orgânicos Inovadores.....	29
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivos Gerais.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Reagentes e Solventes.....	36
4.2 Planejamento Estrutural do Composto LQFM184 (20).....	36
4.3 Metodologia Sintética.....	38
4.3.1 Síntese do Composto 2-(4-Hidroxi-3-Metoxibenzilideno)Malononitrila (17)....	38
4.3.2 Síntese do Composto (<i>E</i>)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida (18).....	39

4.3.3 Síntese do Composto 2,4,6-Tris((<i>E</i>)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida)-1,3,5-Triazina - LQFM184 (20).....	40
4.4 Experimental.....	41
4.4.1 Métodos Cromatográficos.....	41
4.4.2 Medidas do Ponto de Fusão.....	41
4.4.3 Métodos Espectroscópicos.....	41
4.4.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H Unidimensional e ¹ H- ¹³ C Bidimensional.....	41
4.4.3.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	42
4.4.3.3 Espectrometria de Massas.....	42
4.4.3.4 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta.....	43
4.4.3.5 Espectroscopia de Fluorescência.....	44
4.4.4 Avaliação do Potencial Redox por Voltametria Cíclica.....	44
4.4.5 Avaliação da Degradação por Análise Térmica Termogravimétrica.....	45
4.4.6 Determinação do FPUVB através do método espectrofotométrico <i>in vitro</i> proposto por Mansur e colaboradores.....	45
4.4.7 Determinação do perfil toxicológico <i>in vitro</i>	46
4.4.7.1 Avaliação do potencial de irritação ocular através do ensaio de STE.....	46
4.4.7.2 Avaliação da citotoxicidade basal <i>in vitro</i> para estimar DL ₅₀ através do método de captação do corante vermelho neutro.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Composto candidato a protótipo fotoprotetor orgânico - LQFM184 (20).....	50
5.2 Análise Retrossintética.....	51
5.3 Propostas Mecanísticas.....	52
5.3.1 Composto 2-(4-Hidroxi-3-Metoxibenzilideno)Malononitrila (17).....	52
5.3.2 Composto (<i>E</i>)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida (18).....	53
5.3.3 Composto 2,4,6-Tris((<i>E</i>)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida)-1,3,5-Triazina - LQFM184 (20).....	55
5.4 Rota Sintética.....	56

5.5 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados através de métodos espectroscópicos.....	57
5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H Unidimensional e ¹³ C Bidimensional.....	57
5.5.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	61
5.5.3 Espectrometria de Massas.....	65
5.5.4 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta.....	67
5.5.5 Espectroscopia de Fluorescência.....	71
5.6 Avaliação do Potencial Redox por Voltametria Cíclica.....	74
5.7 Avaliação da Degradação por Análise Térmica Termogravimétrica.....	75
5.8 Determinação do FPUVB a partir do método espectrofotométrico <i>in vitro</i> proposto por Mansur e colaboradores.....	77
5.9 Determinação do perfil toxicológico <i>in vitro</i>	79
5.9.1. Avaliação do potencial de irritação ocular através do ensaio de STE.....	79
5.9.2 Avaliação da citotoxicidade basal <i>in vitro</i> para estimar DL ₅₀ através do método de captação do corante vermelho neutro.....	80
6 CONCLUSÕES.....	83
PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
GLOSSÁRIO.....	98
ANEXOS – ESPECTROS SELECIONADOS	

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos maléficos causados pela radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol são cumulativos e severos, tornando indiscutível a necessidade rotineira do uso de fotoprotetores, uma vez que, a exposição aos raios UV é inevitável (VELASCO et al., 2008). Estes por sua vez, devem apresentar eficácia, segurança e ausência de efeitos adversos quanto à proteção da pele, pois o excesso de radiação propicia o desenvolvimento de patologias tais como ceratose actínica, carcinoma, melanoma, sensibilização cutânea, reações fototóxicas e fotoalérgicas e envelhecimento precoce (WHO, 1997; SAYRE et al., 2008).

Nos últimos anos o mercado de fotoprotetores apresentou crescimento significativo, em grande parte justificado por uma maior preocupação com a prevenção do câncer de pele (INCA, 2016; ABIHPEC, 2016).

Desta forma, com o intuito de melhorar as características físico-químicas dos filtros solares e aumentar a adesão da população aos fotoprotetores, está em ascensão o desenvolvimento de protótipos com características inovadoras. Dentre estas, recomenda-se que apresentem amplo espectro de absorção da radiação UV, com cromóforos que absorvam tanto na faixa da UVB (290 – 320 nm) quanto na faixa da UVA (320 – 400 nm) (SHAATH, 2007).

Concomitantemente, para manter a segurança ao contato com a pele, os filtros solares devem ser fotoestáveis quando expostos à radiação UV, ao passo que ao sofrerem transições eletrônicas ocasionadas pela absorção da radiação, estes compostos não podem sofrer isomerização e fragmentação em sua estrutura molecular (MANCEBO; HU; WANG, 2014; NASH; TANNER, 2014). Além disso, devem agir nas camadas mais superiores do tecido cutâneo, para evitar, tanto quanto possível, a absorção sistêmica. Estudos realizados por Bos e Meinardi (2000) propõe que a absorção percutânea de compostos fotoprotetores que apresentem peso molecular acima de 500 Da pode ser drasticamente diminuída.

Os estudos toxicológicos necessários para registro global incluem toxicidade aguda oral e dérmica; sensibilização da pele, irritação ocular e dérmica; fotoirritação, fotossensibilização; toxicidade subcrônica oral e tópica; toxicidade crônica; ação sobre fertilidade: desenvolvimento embrionário precoce; toxicidade embriofetal e toxicidade peri/pós-natal; absorção percutânea *in vitro* e *in vivo*; carcinogenicidade;

fotocarcinogenicidade; segurança e eficácia em humanos (NOHYNEK; SCHAEFER, 2001; ANVISA 2012b).

Para assegurar a eficácia fotoprotetora, os filtros devem apresentar elevada capacidade absorvedora da radiação UV com valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) acima de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SHAATH, 2007).

Após a definição dos parâmetros relacionados com a estrutura química do composto candidato a fotoprotetor, este deve ser submetido a testes *in vivo* e *in vitro* para quantificação do Fator de Proteção Solar (FPS). Este, por sua vez, quantifica a proteção que um determinado produto fotoprotetor é capaz de oferecer, em termos de tempo de exposição, contra a queimadura solar se comparado à exposição desprotegida (FDA, 1999).

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar um protótipo candidato a fotoprotetor – LQFM184 – que apresente amplo espectro de absorção e que seja fotoestável quando exposto à radiação ultravioleta, além de seguro quando em contato com a pele e eficaz quanto à determinação do fator de proteção solar em relação à absorção das radiações UVB e UVA.

A realização deste estudo justifica-se pela crescente demanda de produtos fotoprotetores eficazes na prevenção dos danos causados pela radiação ultravioleta, com destaque para o câncer de pele e o envelhecimento precoce.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PELE X RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

2.1.1 O Espectro Solar

O Sol possui cerca de 5 bilhões de anos e está a 93 milhões de quilômetros da Terra. Seu núcleo produz temperaturas que excedem 15.000.000°C (SHAATH, 2007). Conseqüentemente, emite radiações com vários comprimentos de onda dentro do espectro de radiação eletromagnética, *i.e.*, raios gama, raios X, que fazem parte da radiação ionizante; ultravioleta, visível, infravermelho, ondas curtas, de rádio e ondas longas, que por sua vez compõem a radiação não ionizante (**Tabela 1**) (RANGEL; CORRÊA, 2002). Quase todas podem atuar de forma benéfica, porém, quando a quantidade de energia absorvida é superior à dose tolerável os riscos são potenciais (EPSTEIN, 1990).

Tabela 1 – Composição e características da radiação solar não ionizante.

Radiação	Comprimentos de Onda (λ nm)	Energia (KJ mol ⁻¹)	Incidência Terrestre (%)
Infravermelho (IV)	800 – 5.000	0,12 – 150	40 – 50
Visível (VIS)	400 – 800	150 – 310	40 – 50
Ultravioleta (UV)	100 – 400	310 – 12.000	05 – 10

Fonte: Adaptado de EPSTEIN, 1990.

A radiação eletromagnética emitida pelo Sol caracteriza-se pelo seu comprimento de onda (λ) e pela sua frequência (ν). Sendo a velocidade da luz c constante ($3,0 \times 10^{10}$ cm/s), a equação de Planck (**Equação 1**) define que quanto menor o comprimento de onda (λ), maior a quantidade de energia (E) transportada, considerando a constante de Planck (h) igual a $6,63 \times 10^{-34}$ J s.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 1}$$

Neste sentido, o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia que as radiações conduzem, assim como a potência radiante de um feixe é diretamente proporcional ao número de fótons por segundo (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991; OLIVEIRA et al., 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN,

2002). Todavia, a radiação UV possui subdivisões em função de diferentes comprimentos de onda (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Subdivisões da radiação UV.

Radiação UV	Comprimentos de Onda (λ nm)	Incidência Terrestre (%)
UVA I	340 – 400	95
UVA II	320 – 340	95
UVB	290 – 320	5
UVC	200 – 290	0 (Barrada pela camada de ozônio)

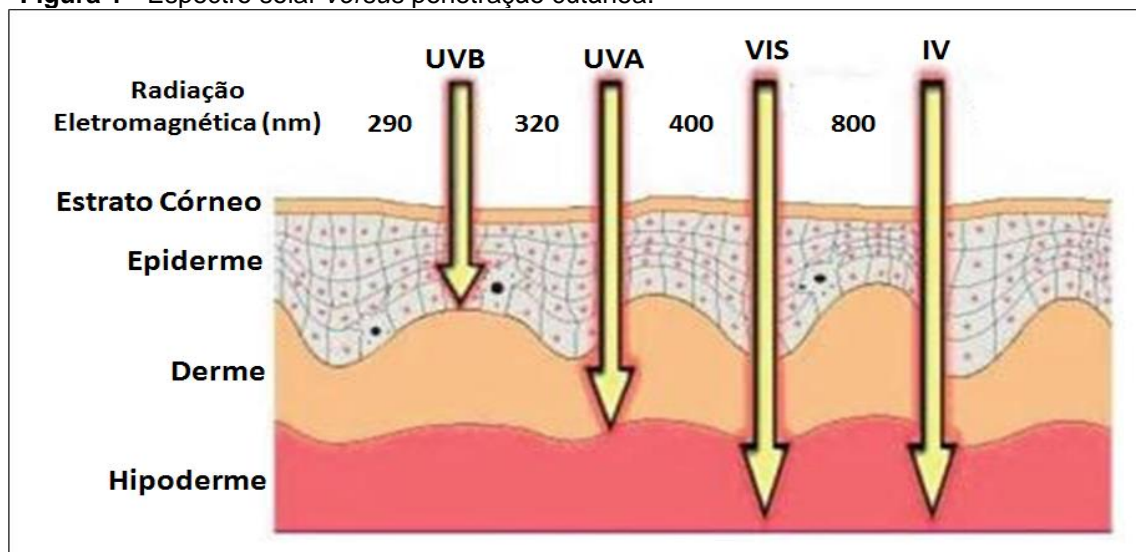
Fonte: Adaptado de ANVISA, 2012a; SHAATH, 2007.

O alcance e a intensidade com que estas radiações atingem a superfície da Terra e, conseqüentemente, a pele depende não só do comprimento de onda de cada radiação como também da estação do ano, da latitude, da altitude e dos hábitos individuais (OLIVEIRA et al., 2004). Outros fatores podem influenciar, indiretamente, através da reflexão ou dispersão da radiação UV, tais como a água, o acrílico, o vidro, a areia da praia, a neve e até mesmo o asfalto (LUCAS et al., 2006).

Os raios UVC não chegam à superfície terrestre, pois são bloqueados pela camada de ozônio (DE ARAUJO; DE SOUZA, 2008). Atualmente, sabe-se que os raios UVB, apesar de possuir menor comprimento de onda em relação à UVA e menor poder de penetração na pele, são intensamente absorvidos pela epiderme devido a sua alta energia (LUND; TIMMINS, 2007). É responsável pelos danos agudos e crônicos à pele, tais como manchas, queimaduras, descamação, câncer de pele, envelhecimento precoce, bem como danos ao DNA epidérmico e às células de Langerhans, suprimindo a resposta imunológica (HEENEN; GIACOMONI; GOLSTEIN, 2001). Por possuírem maiores comprimentos de onda os raios UVA são menos energéticos e de 600 a 1000 vezes menos eritematogênicos. Penetram mais profundamente na camada dérmica com possíveis danos cumulativos aos componentes estruturais da pele (WHO, 1997; SAYRE et al., 2008). A radiação UVA promove a etapa de iniciação de radicais livres responsáveis pelo envelhecimento cutâneo precoce e por doenças de fotossensibilidade, além de ser o principal agente causador de desenvolvimento de melanoma (DE ARAUJO; DE SOUZA, 2008).

De modo geral, a radiação UV é responsável por 90% dos danos causados à pele por penetrar profundamente no estrato córneo (**Figura 1**), afetando a renovação celular e diminuindo sua elasticidade (VOLKOVOVA et al., 2012; ZACARÍAS, 2014).

Figura 1 - Espectro solar versus penetração cutânea.



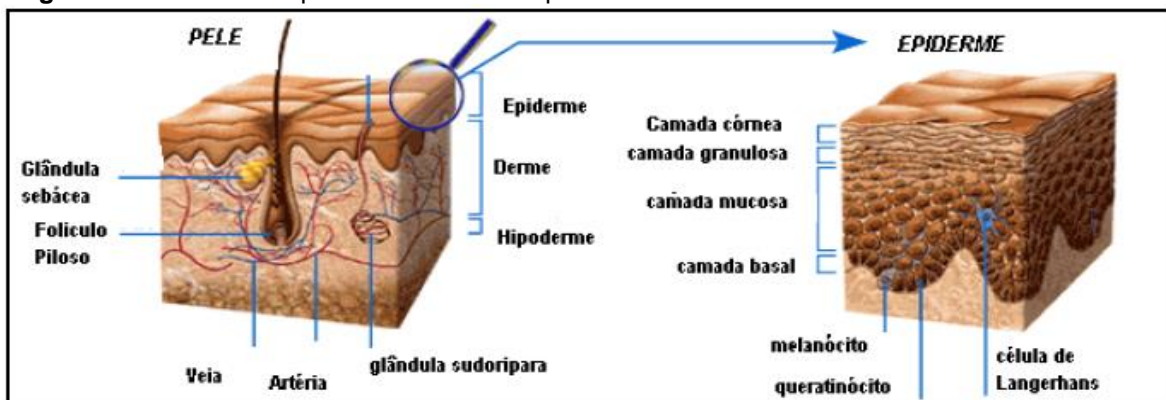
Fonte: Adaptado de VOLKOVOVA et al., 2012; ZACARÍAS, 2014.

A radiação visível se estende entre 400 e 800 nm enquanto os raios infravermelhos apresentam comprimentos de onda entre 700 nm e 2000 nm. Os comprimentos de onda entre 700 e 1500 nm atravessam completamente a pele, dependendo da espessura, cor e características individuais. A faixa de 1500 a 5000 nm é barrada pela epiderme e derme. Os comprimentos acima de 5000 nm não atravessam o estrato córneo (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002; VOLKOVOVA et al., 2012; ZACARÍAS, 2014).

2.1.2 Fotoenvelhecimento e Fotocarcinogênese

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal, com superfície de aproximadamente 2,0 m² em uma pessoa acima dos 18 anos. É formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, todas sensíveis aos raios UV (**Figura 2**) (OLIVEIRA et al., 2004; SÁNCHEZ; DELAPORTE, 2008).

Figura 2 - Camadas da pele e estrutura da epiderme.



Fonte: Adaptado de BIODERMA, 2011.

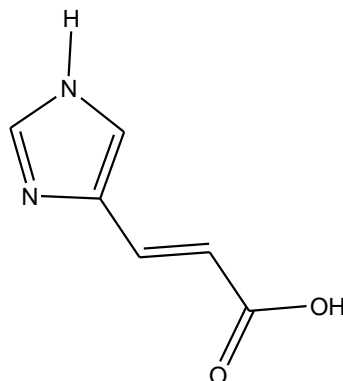
A energia eletromagnética da radiação UV é absorvida pelos cromóforos celulares – espécies absorvedoras, cujos elétrons são capazes de absorver a energia eletromagnética – existentes nas camadas da pele, tais como ácidos nucleicos que formam o DNA, ácido urocânico e aminoácidos aromáticos, os quais absorvem a radiação em comprimentos de onda abaixo de 300 nm (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002). Já a melanina, o principal cromóforo presente na pele, absorve desde 300 até 1200 nm (RANGEL; CORRÊA, 2002).

Dentre os sistemas de defesa do organismo está a inativação do oxigênio singleto reativo (1O_2) e de radicais livres, realizado pela melanina (eumelanina) (SÁNCHEZ; DELAPORTE, 2008), a qual se encontra presente na pele, cabelos e olhos. Seu sistema de absorção ocorre em uma extensa faixa espectral, desde o ultravioleta até as regiões próximas do infravermelho (CHEDEKEL, 1998). É produzida nos melanócitos a partir da tirosina modificada e polimerizada. Os melanócitos transferem a melanina para os queratinócitos através da injeção direta do melanossoma ou de sua liberação no espaço extracelular seguido de sua incorporação pelo queratinócito. Os melanossomas são degradados no citoplasma dos queratinócitos e a melanina é eliminada na superfície cutânea através dos queratinócitos descamantes ou excretada na derme por via linfática (RIBEIRO, 2010; BOSCH et al., 2015).

Outro mecanismo de defesa presente na pele é a secreção sudorípara causada pela exposição à radiação solar, a qual promove a transformação do aminoácido histidina em ácido urocânico ou ácido 4-imidazoilacrílico (**1**), uma substância presente no suor, cuja ação abrange a faixa da UVB, com o máximo de absorção em 297 nm (**Figura 3**). Contudo, esta proteção não é duradoura em função da

evaporação do suor e sua solubilização na água (MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

Figura 3 – Estrutura química do ácido urocânico ou ácido 4-imidazoilacrílico (1).

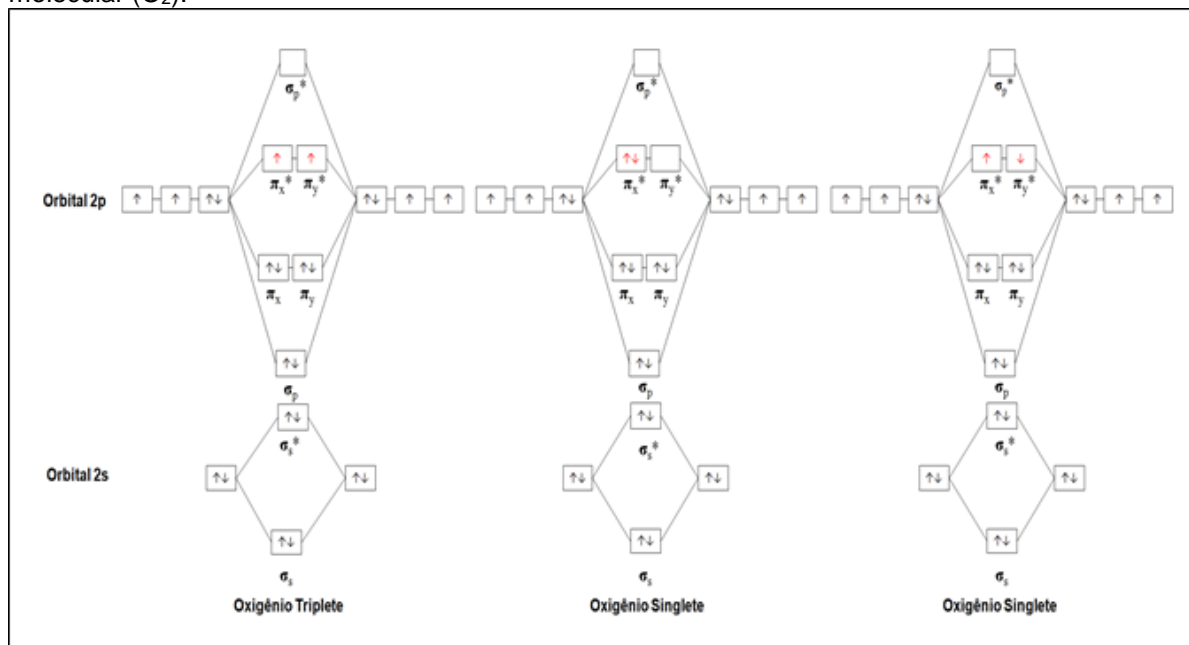


Fonte: OLIVEIRA et al., 2004.

Dentre os diversos problemas de saúde ocasionados por exposição excessiva aos raios solares, tais como sensibilidade à luz, manchas na pele, despigmentação cutânea, queimadura solar, envelhecimento cutâneo e supressão do sistema imunológico, o câncer de pele é o de maior gravidade (VOLKOVOVA et al., 2012).

A radiação ultravioleta absorvida pelos cromóforos, na forma de fótons, é responsável por promover transições eletrônicas, sendo que quando os elétrons retornam ao estado fundamental liberam energia, que, por sua vez, pode ser absorvida pelo oxigênio molecular (O_2) presente nas camadas da pele (SÁNCHEZ; DELAPORTE, 2008; BOSCH et al., 2015). A partir da excitação do oxigênio ocorre a formação de uma série de intermediários químicos tóxicos ao organismo e muito reativos, que não apresentam elétrons desemparelhados na sua última camada de valência, a exemplo do oxigênio singleto (1O_2) (**Figura 4**) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, ao ser biotransformado, gera radicais livres altamente reativos como o hidroxila (HO^{\bullet}), o alcoxila (RO^{\bullet}) e o peroxila (ROO^{\bullet}) (HALLIWELL, 2001; SAID et al., 2007).

Figura 4 – Disposição dos orbitais moleculares para as três configurações eletrônicas do oxigênio molecular (O₂).

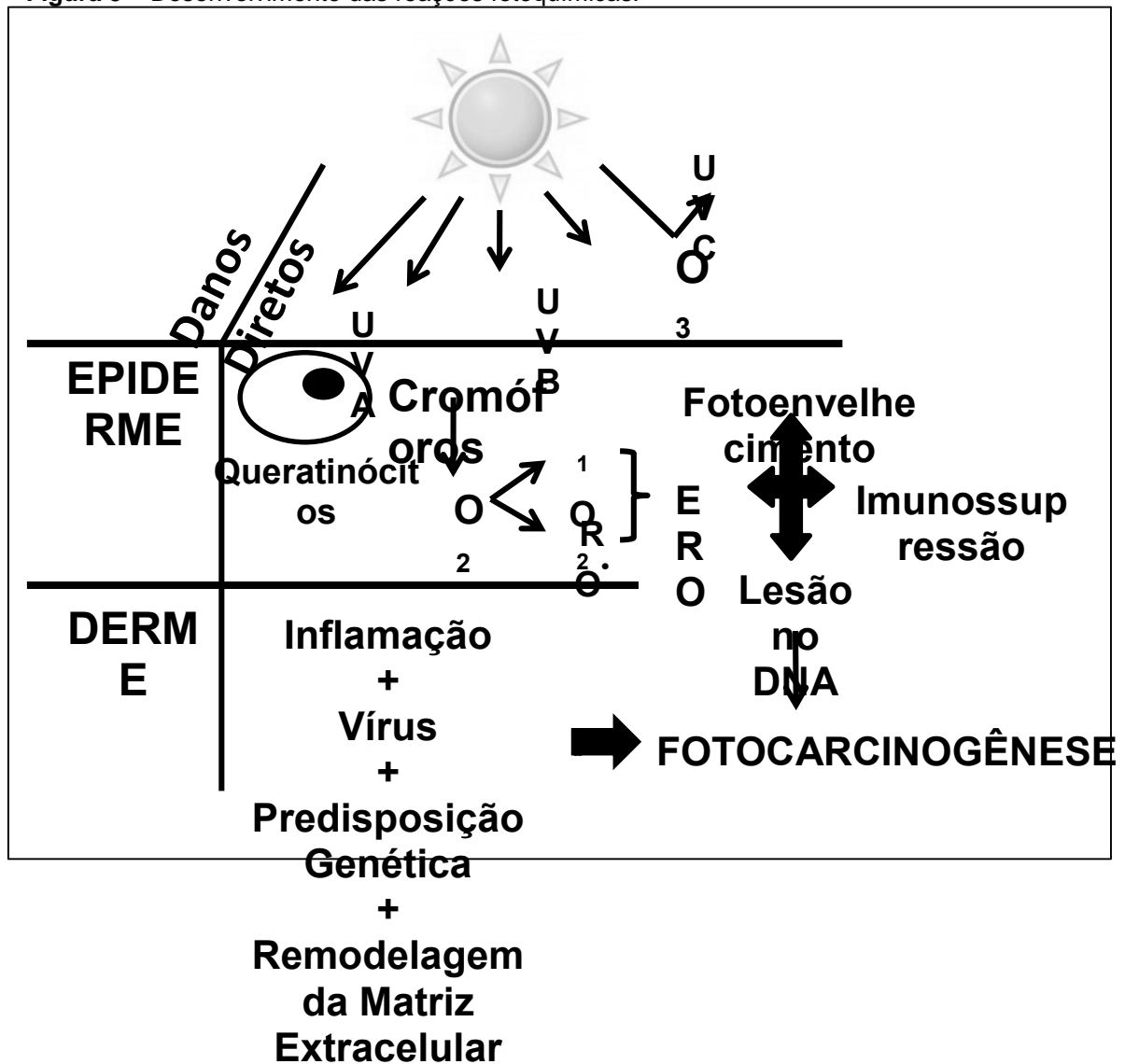


Fonte: Adaptado de SCHWEITZER; SCHMIDT, 2003.

Esse conjunto de radicais livres é denominado de espécies reativas de oxigênio (ERO), equivalentes nitrogenados, gerados a partir do óxido nítrico (NO), os quais são responsáveis pela ativação da cascata de reações radicalares, *i.e.*, iniciação, propagação e terminação, sendo as alterações químicas decorrentes deste fato denominadas de reações fotoquímicas (SÁNCHEZ; DELAPORTE, 2008; BOSCH et al., 2015). Estas culminam com a diminuição dos níveis endógenos de antioxidantes, bem como peroxidação lipídica, inativação enzimática, clivagem do DNA e conseqüentemente, fotoenvelhecimento, imunossupressão e fotocarcinogênese (BAYNES; DOMINICZAK, 2005; SAID et al., 2007; BOSCH et al., 2015).

O fotoenvelhecimento se caracteriza por mudanças microscópicas e macroscópicas que ocorrem em proteínas cutâneas, como o colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (MIYACHI, 1995; SAID et al., 2007), manifestadas por lesões pigmentadas como a ceratose actínica. A fotocarcinogênese ocorre devido a lesões no DNA associado ao alto nível de produção de dímeros de pirimidina, que na ausência de mecanismo de reparo podem originar mutações, que somadas a eventos como diminuição da resposta imunológica, do nível de antioxidantes, possíveis infecções por vírus e predisposição genética levam ao desenvolvimento do câncer (LAUTENSCHLAGER et al., 2007; BOSCH et al., 2015) (**Figura 5**).

Figura 5 – Desenvolvimento das reações fotoquímicas.



Fonte: Adaptado de MATHEUS; KUREBAYASHI, 2002; BOSCH et al., 2015.

Dentre os tipos de câncer de pele o carcinoma de células basais é o mais frequente, sendo responsável por 80% dos casos de câncer de pele do tipo não melanoma. Origina-se na camada mais profunda da epiderme, em partes do corpo que ficam, constantemente, expostas ao Sol (LONGSTRETH et al., 1998; INCA, 2016). O carcinoma espinocelular – células escamosas – é o menos comum e origina-se na camada média da epiderme (RIBEIRO, 2010). Em geral, o carcinoma de células escamosas está associado ao acúmulo das doses de exposição à radiação UV, enquanto que o carcinoma basocelular está associado à exposição intermitente ao ultravioleta em altas doses (INCA, 2016).

O melanoma é o terceiro tipo e o mais raro de todos os tumores de pele, porém, é o mais agressivo. Resulta da transformação maligna dos melanócitos, sendo

responsável pelo desenvolvimento de metástases. Acomete principalmente os caucasianos que moram em países com alta intensidade de radiação ultravioleta. Seu surgimento pode ser provocado por contínuas e prolongadas exposições ao Sol na infância até a fase adulta (LONGSTRETH et al., 1998; BOSCH et al., 2015).

A fotoproteção exógena inclui todos os métodos e estratégias utilizados com a finalidade de diminuir os efeitos adversos da radiação que incide sobre a pele. Este objetivo pode ser atingido evitando-se a exposição solar prolongada, principalmente em horários de maior incidência de radiação, bem como a utilização de bonés, chapéus, roupas adequadas, óculos solares e principalmente fotoprotetor (ADAD, 2007; SBD, 2016). Dentre as medidas preventivas sugeridas pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), os fotoprotetores se destacam por sua eficácia (SBD, 2016). Alguns estudos apontam que a prevenção de danos agudos e crônicos à pele está ligada à necessidade de proteção contra a radiação UV em amplo espectro (UVA-UVB) (MOYAL; FOURTANIER, 2008).

2.1.3 Impacto Sócio-Econômico do Câncer de Pele

O câncer no Brasil ganha relevância pelo seu perfil epidemiológico, no qual pesquisas recentes demonstram que essa doença é responsável por uma em cada quatro mortes, sendo considerada a segunda causa de mortalidade no mundo, ficando atrás apenas dos óbitos decorrentes de problemas cardiovasculares (INCA, 2016).

O principal fator de risco para o câncer de pele, tanto para melanoma quanto para não melanoma, é a exposição prolongada à radiação solar de forma desprotegida. Para o tipo não melanoma, em particular para o carcinoma epidermoide, a incidência aumenta com a idade, sendo mais frequente na população masculina do que feminina. No Brasil, as estimativas para os anos de 2016 apontam para a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer. Nesta vertente, o câncer de pele destaca-se como o de maior incidência, com 182 mil casos do tipo não melanoma, representado por 98.420 casos novos em homens e 83.710 em mulheres. Quanto ao melanoma, sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa, com 2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres. Possivelmente existe um sub-registro dessas neoplasias em função do subdiagnóstico, sendo as taxas de incidência e os números esperados de casos novos, subestimados (INCA, 2016).

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) o câncer de pele é o câncer mais diagnosticado nos Estados Unidos com ocorrência de aproximadamente 5 milhões de casos, com custos anuais estimados de 1,8 bilhões de dólares. O *National Cancer Institute* estimou que mais de 76 mil novos casos de melanoma foram diagnosticados em 2015 com mais de 10 mil mortes. Sendo o tipo de câncer de pele mais comum em adolescentes e adultos, com custos anuais de tratamento em torno de 3,3 bilhões de dólares (PHRMA, 2016).

Órgãos oficiais internacionais como *American Cancer Society* (ACS) e *American Academy of Dermatology* (AAD) estimam que um terço dos óbitos decorrentes de câncer apresente correlação com obesidade, sedentarismo, hábitos inadequados de alimentação, bem como exposição à radiação solar. Isto significa que mudanças de hábitos podem contribuir profilaticamente (AAD, 2015; ACS, 2015; PHRMA, 2016). É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cuja prevenção, monitoramento continuado e controle dos fatores de risco devem ser priorizados em todas as regiões. Para a prevenção do câncer de pele é recomendado práticas de segurança em exposição ao Sol como a utilização rotineira de filtro solar (INCA, 2016).

Dentro destas vertentes, cabe ao mercado farmacêutico e aos centros de pesquisas continuarem investindo em novos candidatos a protótipos de fotoprotetores a fim de obter produtos eficazes e seguros quanto à absorção da radiação solar e, assim diminuir, gradualmente, a incidência de câncer de pele em todo o mundo.

2.2 FILTROS SOLARES

Os filtros solares surgiram quando se observou que existiam substâncias capazes de prevenir queimaduras na pele causadas pelos raios solares. No início do século XX era observado que o sulfato de quinina e, mais tarde, o Antilux ou 2-naftol-6,8-dissulfonato de sódio, preveniam o aparecimento de eritemas (URBACH, 2001). Ao longo deste século muitas substâncias foram utilizadas com eficácia relativa na prevenção de queimaduras solares e seu uso se tornou mais popular após a Segunda Guerra Mundial com o ácido *para*-aminobenzóico (PABA), patenteado e introduzido no mercado em 1946 (SHAATH, 2010).

Filtros solares são compostos químicos, que atualmente são encontrados em muitos tipos de produtos para cuidados da pele. Inicialmente, foram desenvolvidos

para prevenir queimaduras solares, ao passo que evoluíram para proteger a camada cutânea contra outros efeitos nocivos da radiação UV (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Estas substâncias podem ser divididas em filtros orgânicos e inorgânicos, sendo lipofílicos ou hidrofílicos, sólidos ou líquidos. De acordo com o espectro de absorção podem ser caracterizados em absorvedores ou refletores/refratores de radiação UVA e/ou UVB (RANGEL; CORRÊA, 2002).

2.2.1 Filtros Inorgânicos

Os filtros inorgânicos, também chamados de filtros físicos, são pós inertes, opacos, insolúveis em água e materiais graxos (RIBEIRO, 2010). Os compostos mais usados e aprovados tanto nos Estados Unidos quanto no Japão e na Europa são o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO). Embora ambos sejam oriundos de metais, possuem propriedades óticas diferentes, especialmente quando na forma de micropartículas ou nanopartículas (PINNELL et al., 2000; GINESTAR, 2003; BOTTA et al., 2011). Estes óxidos metálicos possuem baixos potenciais alergênicos e não apresentam absorção percutânea. Formam uma barreira física sobre a pele, refletindo e/ou espalhando a radiação UVA e UVB (SHAATH, 2007; WOLF et al., 2001).

Atualmente, os óxidos usados como filtros solares são incorporados às formulações na forma de nanopartículas com tamanhos da ordem da radiação que se quer espalhar, na faixa de 70-200 nm. Essas versões nanoparticuladas, também chamadas de pigmentos microfinos, representam grande avanço, porque não deixam películas brancas de filtro visível sobre a pele (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2000; DE PAOLA; RIBEIRO, 1998). A relação entre este espalhamento, tamanho de partícula e comprimento de onda da radiação incidente é expressa pela teoria de Lorenz-Mie (**Equação 2**) (KERKER, 1969):

$$I_R = \frac{16\pi^4 R^6}{r^2 \lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 + 2n_2^2} \right)^2 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo I_R - intensidade de espalhamento da radiação; R - raio da partícula; λ - comprimento de onda da radiação incidente; r - distância entre amostra e o detector; n_1 - índice de refração da partícula e n_2 - índice de refração do meio.

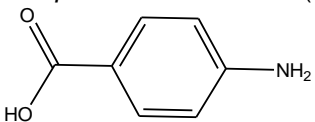
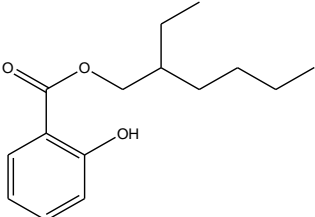
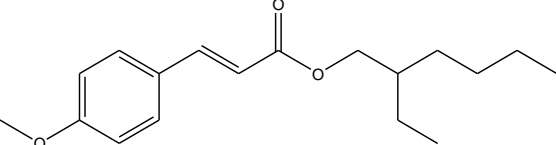
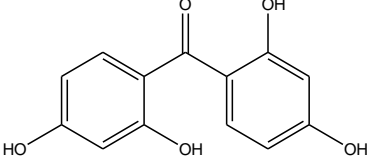
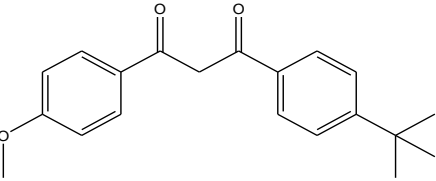
Desta forma, a intensidade do espalhamento da radiação depende do comprimento de onda e é proporcional ao raio da partícula (R) do filtro inorgânico

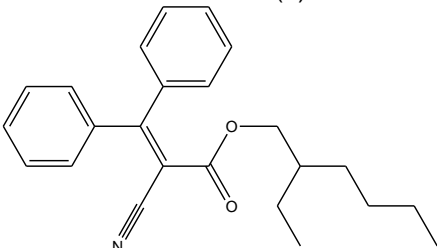
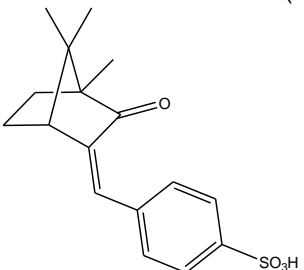
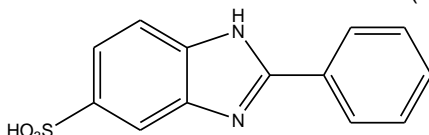
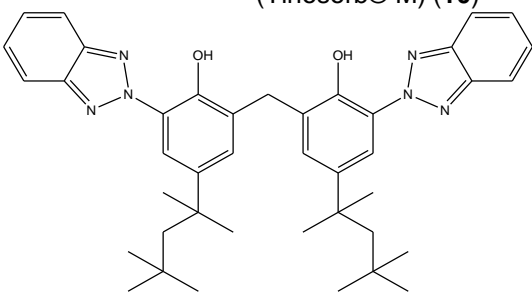
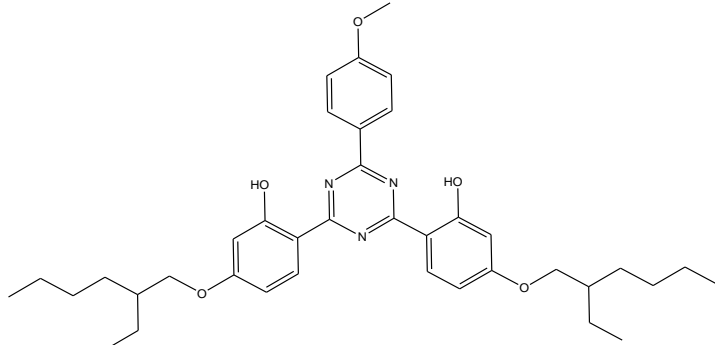
(FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC número 47, de 16 de março de 2006, restringiu o uso destes fotoprotetores em concentração máxima de 25% em formulações comerciais (ANVISA, 2006).

2.2.2 Filtros Orgânicos

Os filtros orgânicos ou químicos atuam, basicamente, na absorção da radiação UV, mas podem, também, refletir e emitir a radiação ao mesmo tempo, convertendo-a em radiações menos nocivas à saúde humana (SHAATH, 2007). De acordo com a estrutura química são classificados conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3 - Classificação dos filtros solares orgânicos.

Fotoprotetores Orgânicos	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Proteção UV
<p>Ácido <i>para</i>-aminobenzóico (2)</p> 	290	UVB
<p>Salicilato de Octila (3)</p> 	300, 310	UVB
<p><i>para</i>-Metoxicinamato de Octila (4)</p> 	310	UVB
<p>Benzofenona 2 (5)</p> 	286, 324	UVB, UVA II
<p>Avobenzona (6)</p> 	357	UVA I

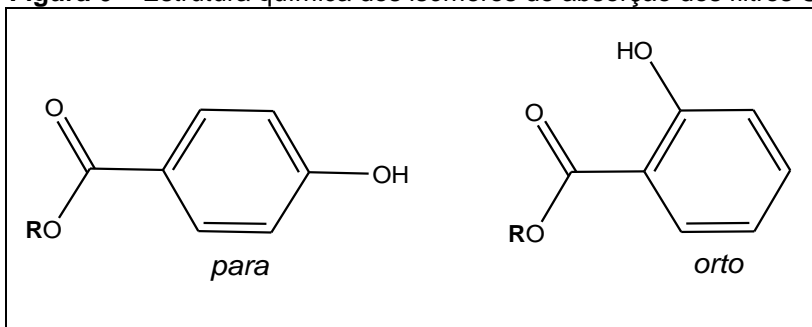
<p>Octocrileno (7)</p> 	303	UVB
<p>Metilbenzidileno Cânfora (8)</p> 	345	UVA I
<p>Ácido Fenilbenzimidazol Sulfônico (9)</p> 	270, 360	UVB, UVA I
<p>Metileno-Bis-Benzotriazolil Tetrametilbutilfenol (Tinosorb® M) (10)</p> 	305, 360	UVB, UVA I
<p>Bis-Etilexilofenol Metoxifenil Triazina (Tinosorb® S) (11)</p> 	310, 343	UVB, UVA I

Fonte: MANCEBO; HU; WANG, 2014.

Os protetores solares orgânicos são essencialmente sistemas aromáticos conjugados a subunidades que aumentam (-NH₂, -OCH₃, -OH) e/ou diminuem (-CO₂R) a densidade eletrônica do sistema conjugado, ligados na posição *orto* ou *para* do anel aromático (Figura 6). Esses grupamentos, denominados cromóforos,

atribuem efeito batocrômico ao sistema conjugado e são responsáveis pela absorção da radiação que incide sobre a pele (MANCEBO; HU; WANG, 2014).

Figura 6 – Estrutura química dos isômeros de absorção dos filtros UV.

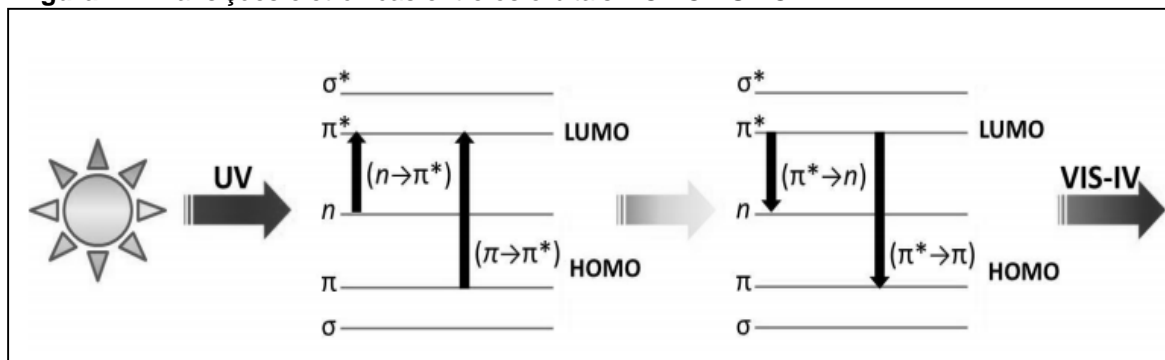


Fonte: SHAATH, 2007.

A natureza do substituinte na posição *orto*, por exemplo, pode conferir efeito batocrômico em função da possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular. Estes compostos absorvem em maiores comprimentos de onda, pois sua ressonância é facilitada pela disponibilidade eletrônica (GASPARRO; MITCHNICK; NASH, 1998; WOLF et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; SHAATH, 2007).

A presença de cromóforos ligados ao sistema aromático permite a conjugação de elétrons entre os mesmos, o que favorece as transições eletrônicas entre os orbitais de fronteira *High Occuped Molecular Orbital* (HOMO) e *Low Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO) (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Durante a absorção da radiação UV, os elétrons situados no orbital ligante ou fundamental π HOMO recebem energia eletromagnética UV e são promovidos para o orbital antiligante ou excitado π^* LUMO passando a ocupar um orbital de maior energia. No entanto, os elétrons não permanecem no orbital π^* *ad eternum* e, ao retornarem para o orbital ligante, dissipam a radiação eletromagnética absorvida anteriormente, sendo o processo global denominado de transições eletrônicas (**Figura 7**).

Figura 7 – Transições eletrônicas entre os orbitais HOMO-LUMO.

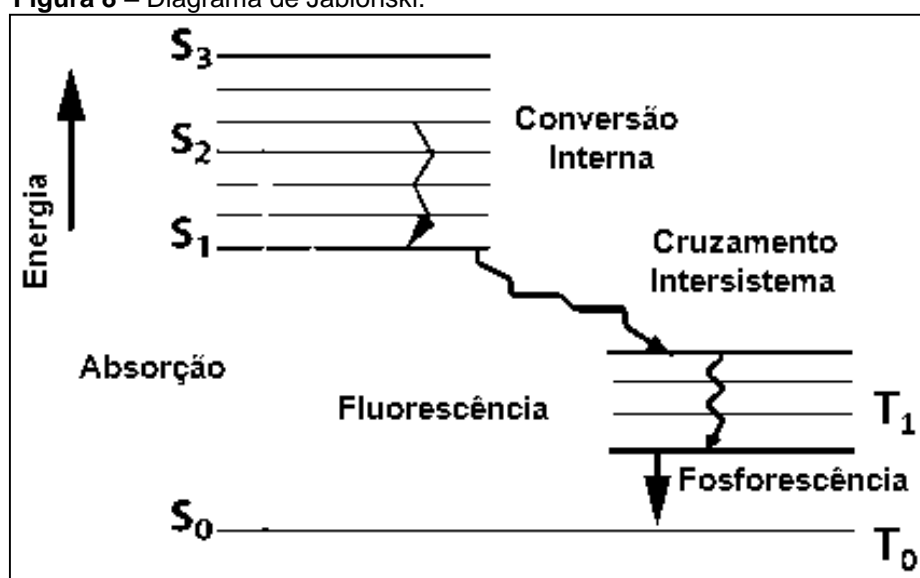


Fonte: Adaptado de NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014.

Átomos ou moléculas podem emitir a energia absorvida quando elétrons, no estado excitado, decaem ao estado fundamental. O processo de formação e desativação dos estados excitados de átomos e moléculas pode ser representado

através do diagrama de Jablonski, no qual as energias relativas dos estados envolvidos assim como os processos de desativação radiativos e não radiativos são representados (LAKOWICZ, 2006). À temperatura ambiente, a maioria das moléculas mantém-se no estado fundamental S_0 . Neste nível, a absorção de um fóton pode levar as moléculas para um dos níveis vibracionais excitados de S_1 , S_2 ou S_3 . Uma vez excitados, o excesso de energia da molécula pode ser dissipado através de processos de conversão interna, cruzamento intersistema, fluorescência e fosforescência (**Figura 8**) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

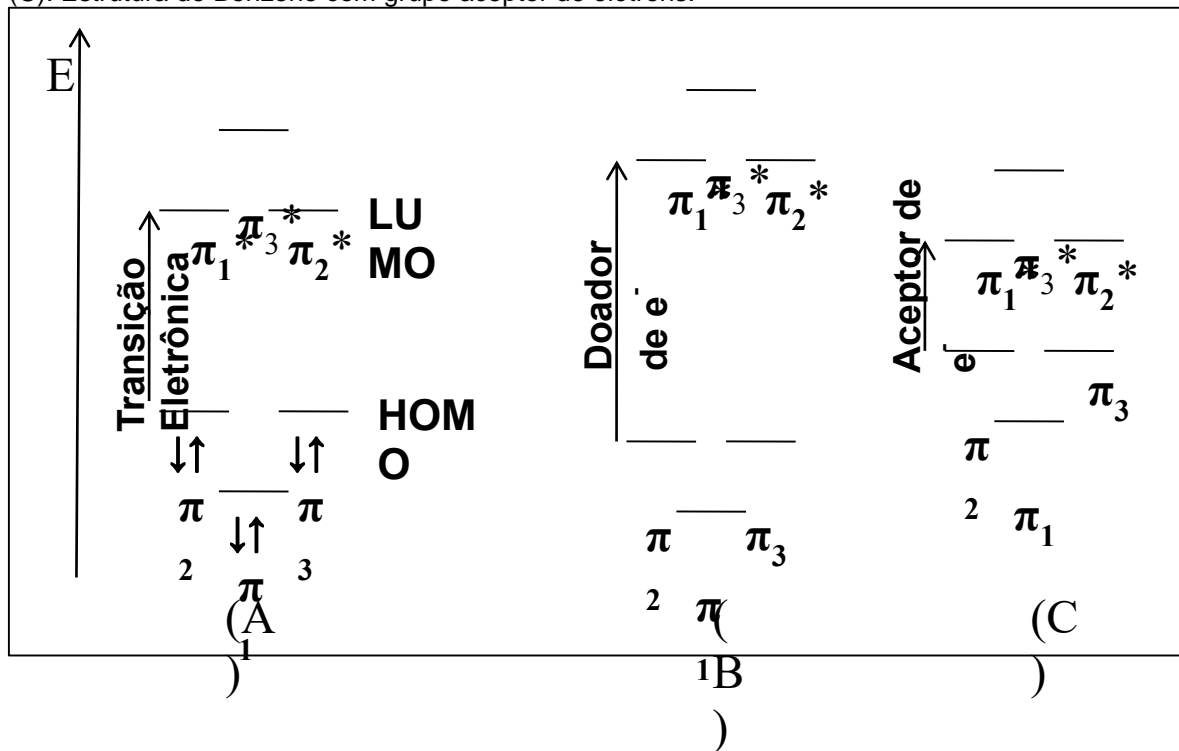
Figura 8 – Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de LAKOWICZ, 2006.

Para entender as diferenças nos máximos de absorção que ocorrem com os filtros solares, pode-se utilizar a teoria dos orbitais moleculares de maneira simplificada (**Figura 9A**) (SANTOS FILHO, 1999). Ao inserir no anel aromático do benzeno uma subunidade que aumenta a densidade de elétrons, aumenta-se a possibilidade de ressonância e a estabilidade do anel. Sendo mais estável, a energia dos orbitais ligantes diminui e conseqüentemente, a dos antiligantes aumenta, elevando a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (**Figura 9B**), favorecendo assim, a absorção da radiação na faixa da UVB. Por conseguinte, a adição de uma subunidade que diminui a densidade de elétrons do anel promove a redução na estabilidade do sistema aromático. Desta forma, a energia dos orbitais ligantes aumenta e a dos antiligantes diminui, reduzindo a diferença de energia entre os orbitais HOMO-LUMO (**Figura 9C**) e dessa forma promovendo a absorção na região da UVA (GILLAM; STERN, 1957).

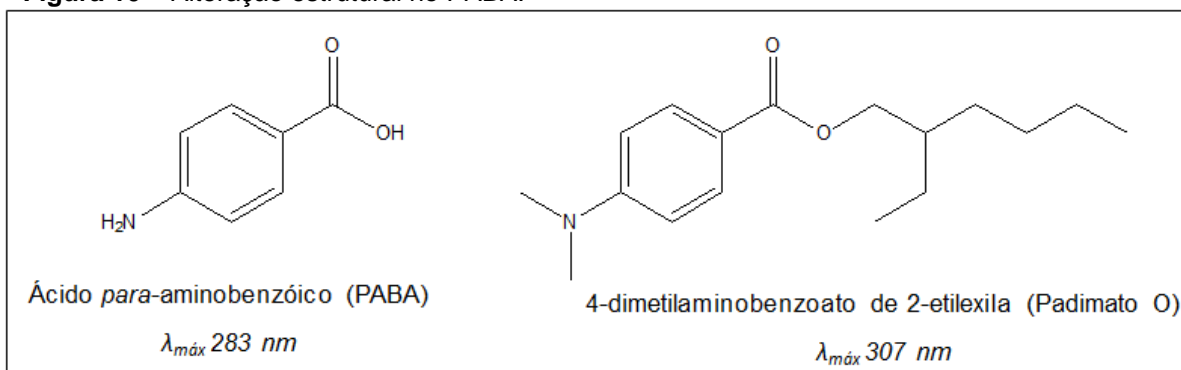
Figura 9 - Esquema do deslocamento de elétrons em um filtro orgânico (ex.: PABA) após absorção da radiação UV. (A): PABA simplificado; (B): Estrutura do Benzeno com grupo doador de elétrons. (C): Estrutura do Benzeno com grupo aceptor de elétrons.



Fonte: Adaptado de GILLAM; STERN, 1957.

Devido aos vários efeitos de conjugação e estabilização, alguns substituintes podem deslocar o comprimento de onda de absorção de filtros solares a exemplo dos grupos metila, hidroxila, alcoxila, halogênio e amina, chamados auxocromos (PAVIA et al., 2010). Casos como do PABA, cuja inserção de cadeias alquílicas em sua estrutura química resultou na obtenção do Padimato O (**Figura 10**), proporcionam aumento da lipofilicidade e, conseqüentemente, a adesão do fotoprotetor à pele evitando sua retirada pela ação da água. Tais alterações estruturais podem conferir diferentes efeitos na absorção da radiação como deslocamento batocrômico (**Figura 10**), hipsocrômico, efeito hiperacrômico e/ou hipocrômico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991; SHAATH, 2007).

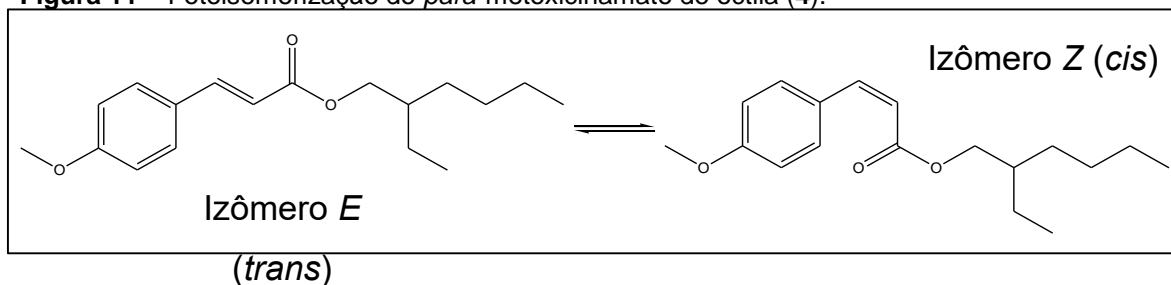
Figura 10 – Alteração estrutural no PABA.



Fonte: Adaptado de SHAATH, 2007.

As diferenças de energia entre níveis eletrônicos na maioria das moléculas variam de 125 a 650 KJ/mol (PAVIA et al., 2010). Ao retornarem ao estado inicial os elétrons dissipam a energia absorvida na faixa do visível (450-800 nm) ou do infravermelho (>800 nm), ou seja, quando a radiação incidente é não destrutiva à estrutura molecular, alguns fotoprotetores orgânicos podem sofrer isomerização fotoquímica *cis-trans*, *i.e.*, *para*-metoxicinamato de octila (**4**) (PATTANAARGSON et al., 2004), no qual estes dissipam a energia absorvida na forma de radiação fluorescente ou fosforescente (**Figura 11**) (WOLF et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; SHAATH, 2007; RIBEIRO, 2010; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

Figura 11 – Fotoisomerização do *para*-metoxicinamato de octila (**4**).



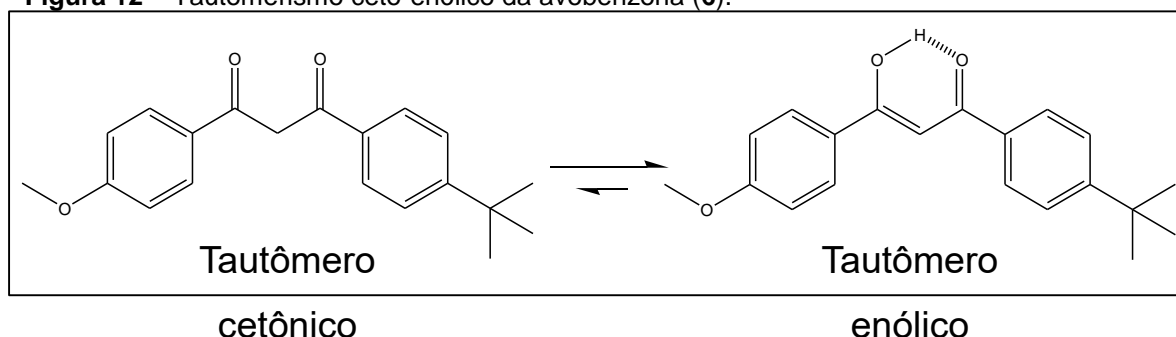
Fonte: Adaptado de SANTOS; MIRANDA; SILVA, 2012.

Estes compostos são considerados fotoestáveis e dissipam a energia processada durante a fotoisomerização, sendo que ao absorver a radiação UV o isômero *E* (*trans*) é convertido ao isômero *Z* (*cis*), mais energético. Durante o retorno à configuração original mais estável (Isômero *E*), ocorre a liberação de energia na região do infravermelho e do visível, sendo este um processo contínuo (SANTOS; MIRANDA; SILVA, 2012).

Os filtros solares orgânicos podem, também, sofrer tautomerismo do tipo ceto-enólico sendo classificados como fotolábeis. A ressonância facilitada pela

disponibilidade eletrônica do tautômero enólico o torna mais estável do que o tautômero cetônico. Tal processo pode ser observado no caso da avobenzona (**6**), na qual os tautômeros ceto-enólicos absorvem em $\lambda_{\text{máx}}$ 260 nm (UVC) e 357 nm (UVA), respectivamente (**Figura 12**) (PAVIA et al., 2010; KOCKLER et al., 2012; YAMAJI; KIDA, 2013).

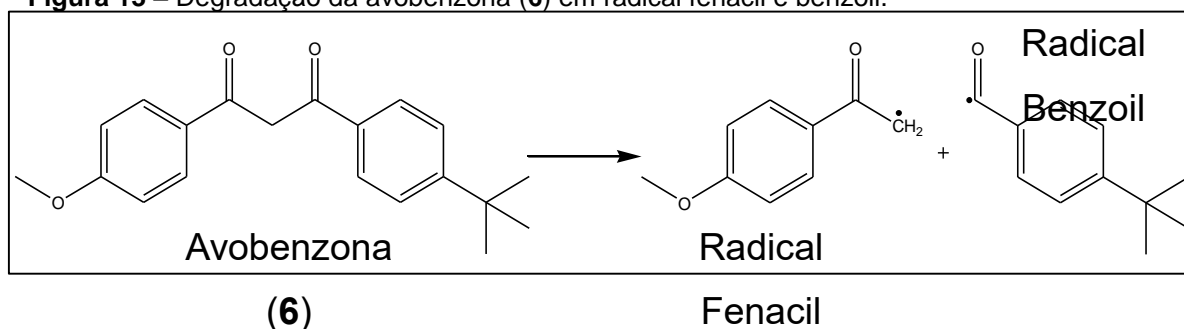
Figura 12 – Tautomerismo ceto-enólico da avobenzona (**6**).



Fonte: KOCKLER et al., 2012; YAMAJI; KIDA, 2013.

Como resultado destas reações de fotoisomerização ou tautomerismo, podem ser formadas estruturas de degradação que comprometem a habilidade de absorção da radiação UVB e/ou UVA dos filtros orgânicos, e conseqüente diminuição da eficiência dos fotoprotetores ao longo do tempo de exposição solar (**Figura 13**). (KOCKLER et al., 2012; YAMAJI; KIDA, 2013)

Figura 13 – Degradação da avobenzona (**6**) em radical fenacil e benzoil.



Fonte: KOCKLER et al., 2012; YAMAJI; KIDA, 2013.

A perda da capacidade fotoprotetora pode atingir até 38% dependendo dos constituintes da preparação cosmética (HUONG et al., 2007; MACMANUS-SPENCER et al., 2011). Desta forma, o desenvolvimento racionalizado de filtros solares constitui uma ampla e promissora área de pesquisa, cujo intuito é desenvolver produtos fotoprotetores com maior fotoestabilidade e determinar como este parâmetro afeta a capacidade de proporcionar a proteção UV necessária.

2.2.3 Fator de Proteção Solar (FPS)

Devido à relevância da fotoproteção com relação à manutenção da saúde, tem-se estabelecido critérios rigorosos para os fotoprotetores, principalmente quanto aos parâmetros de avaliação e classificação das formulações contendo filtros solares, assim como a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). Este fator estabelece o tempo de exposição à radiação solar com o produto fotoprotetor aplicado sobre a pele sem a ocorrência de eritema, tendo em vista que, quanto maior o FPS apresentado pelo produto fotoprotetor maior será o tempo permitido para uma exposição segura à radiação ultravioleta (ANVISA, 2012a).

A avaliação do FPS pode ser realizada por métodos *in vivo* e *in vitro*. Para registro de fotoprotetores na ANVISA, em consonância com o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), devem ser apresentados relatórios de testes de eficácia realizados *in vivo*, seguindo as metodologias *United States Food and Drug Administration* (FDA). Assim como o Método Internacional de Avaliação de FPS de 2006 descrito pelo grupo composto por *European Trade Association representing Cosmetic Industry* (COLIPA), *Japan Cosmetic Industry Association* (JCIA) e *Cosmetics, Toiletries and Fragrance Association* (CTFA-AS), que representam as associações de indústrias cosméticas da Europa, Japão e África do Sul, respectivamente. Além da norma australiana *Therapeutic Goods Act* (TGA), utilizada na Austrália e Nova Zelândia, que avalia somente a influência da radiação UVB. Estes métodos *in vivo* utilizam voluntários humanos para determinar o FPS e por isso são contestados por alguns autores (MANSUR et al., 1986; DIFFEY et al., 1997; RUVOLO JÚNIOR, 1997; KHOURY; NAKANO, 2007).

A determinação do nível da proteção UVA (FPUVA) deve ser realizada conforme as metodologias *in vivo* *European Commission – Standardization Mandate Assigned to CEN Concerning Methods for Testing Efficacy of Sunscreen Products - 2006 Annex 2 - Determination of the UVA protection factor based on the principles recommended by the Japanese Cosmetic Industry Association (PPD method published 15.11.1995)*; *COLIPA Guideline, In Vitro Method for the Determination of the UVA Protection Factor and "Critical Wavelength" Values of Sunscreen Products, 2009*. A amplitude da proteção UV deve ser avaliada através do comprimento de onda crítico a ser determinado conforme as metodologias mencionadas (ANVISA, 2012a).

A eficácia dos filtros solares é dependente do intervalo, da capacidade e do comprimento de onda onde ocorre absorção máxima no espectro do UV, sendo proporcional às concentrações de cromóforos absorvedores e/ou refletores de radiação ultravioleta que os compõem. A associação de diferentes filtros orgânicos e inorgânicos em formulações é um recurso para melhorar a eficácia e potencializar o efeito FPS (DE PAOLA; RIBEIRO, 1998).

2.2.3.1 Fator de Proteção UVB (FPUVB)

A metodologia para avaliação do FPUVB *in vivo* é a mais aceita pela comunidade científica e exigida pela legislação brasileira atualmente. Para declarar o FPS no rótulo de uma formulação fotoprotetora, após seu desenvolvimento, é necessária a determinação do grau de proteção promovido em relação à dose de radiação recebida, conforme as normas da resolução nº 30 de 1º de junho de 2012 da ANVISA (ANVISA, 2012a).

A avaliação *in vivo* requer um mínimo de 25 voluntários para um teste estatisticamente significativo e com tipos de pele de I a III, segundo a escala Fitzpatrick de 1976, que classifica a pele em fototipos a partir da capacidade de cada pessoa em se bronzear quando em exposição solar (**Tabela 4**) (SBD, 2016).

Tabela 4 – Classificação dos fototipos cutâneos a partir da escala Fitzpatrick.

Grupo/Cor da Pele	Eritema	Pigmentação	Sensibilidade ao Sol
I – Branca	Sempre Queima	Nunca Bronzeia	Muito Sensível
II – Branca	Sempre Queima	Bronzeia Muito Pouco	Sensível
III – Morena Clara	Queima Moderadamente	Bronzeia Moderadamente	Sensibilidade Normal
IV – Morena Moderada	Queima Pouco	Sempre Bronzeia	Sensibilidade Normal
V – Morena Escura	Queima Raramente	Sempre Bronzeia	Pouco Sensível
VI – Negra	Nunca Queima	Totalmente Pigmentada	Insensível

Fonte: Adaptado de SBD, 2016.

A quantidade padronizada de produto aplicado deve ser de 2 mg/cm² numa área mínima de 50 cm², sob irradiação simulada (94% de 290 - 400 nm) com lâmpada UV de 300 W, vinte minutos após a aplicação do produto. A dose de radiação incidente é a quantidade de energia a que o voluntário é exposto durante o processo de irradiação solar. A dose mínima seria aquela necessária para produzir sinais de

queimadura na pele do voluntário após período de 16 a 24 horas após a exposição à radiação UVB, sendo denominada Dose Mínima Eritematógena (DME) expressa em KJ/minutos (ANVISA, 2012a).

O padrão utilizado pelo FDA é uma formulação contendo 8% de salicilato de homomentila com FPS de 4,47 (ANVISA, 2012a). Para a metodologia COLIPA a fórmula padrão contém 2,7% de *para*-metoxicinamato de octila (**4**) (FPS $3,7 \pm 0,3$) (COLIPA, 2009). A média final encontrada não pode ser inferior ao FPS declarado na embalagem do produto pelo seu fabricante e a variação dos 25 valores encontrados não pode ser maior que 5% (DE ARAUJO; DE SOUZA, 2008).

Desta forma defini-se o fator de proteção para a UVB (FPUVB) como sendo a relação individual entre a dose mínima de energia UV capaz de provocar eritema na pele protegida pelo fotoprotetor e a dose energética mínima necessária para se obter a mesma resposta na pele desprotegida em função do tempo de exposição (**Equação 3**) (KHOURY; NAKAZAWA; SILVA, 1995; JANOUSEK, 1997, ANVISA, 2012a).

$$FPUVB = \frac{DME \text{ (pele fotoprottegida)}}{DME \text{ (pele fotodesprotegida)}}$$

Equação 3

A DME deve ser determinada empiricamente por muitos dias, para não causar queimadura excessiva na pele dos voluntários como resultado da exposição repetida à radiação UV (WOLF et al., 2001; BLEASEL; ALDOUS, 2008). Além disso, a DME depende do tipo de pele do indivíduo, da quantidade de melanina da pele, do comprimento de onda e da intensidade da radiação incidente (ANVISA, 2012a).

Contudo, o FPS não possui linearidade de proteção UVB e o seu valor somente será alcançado a partir da aplicação da sua porção mínima padronizada. Um FPS 15 já absorve cerca de 93% da radiação UVB, mas desde que aplicado corretamente, se não, por exemplo, numa aplicação quatro vezes menor ($0,5 \text{ mg/cm}^2$) este FPS sofrerá uma redução para 2,0 (**Tabela 5**) (FDA, 1999; GLASER; PRODANOVIC, 2009).

Tabela 5 - Influência da quantidade aplicada de filtro solar no FPUVB.

FPS	Proteção contra a UVB (%) (aproximadamente)	FPS/ Aplicação do Filtro Solar (mg/cm ²)		
		2,0	1,0	0,5
2	50	2,0	1,4	1,2
4	75	4,0	2,0	1,4
8	87	8,0	2,8	1,7
15	93	15	3,9	2,0
30	96	30	5,5	2,3

Fonte: FDA, 1999; GLASER; PRODANOVIC, 2009.

O método de determinação do FPUVB em humanos é indispensável, porém deve ser o último estágio dentro do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos ativos fotoprotetores, pois depende da seleção de voluntários, apresenta custo elevado, além de depender também do acompanhamento de técnicos e médicos especializados (VELASCO et al., 2011).

Agências reguladoras como o FDA e COLIPA fazem testes clínicos *in vivo* usando o aparecimento de eritema como ponto final para determinar o FPUVB de protetores solares tópicos. Estes são testes caros e demorados, que não são práticos para avaliação do produto de rotina. Ainda existem muitas controvérsias sobre a exatidão científica e reprodutibilidade de avaliações *in vivo* (SPRINGSTEEN et al., 1999; PISSAVINI et al., 2003). Assim, ambas as considerações éticas e legais apontam para a maior aceitação ao longo do tempo de técnicas de medição *in vitro*.

A metodologia *in vitro* pode ser, em geral, reproduzida através de métodos que envolvem a medição da absorção ou a transmissão de radiação UV em filmes de fotoprotetores aplicados sob diferentes substratos tais como Transpore® (DIFFEY; ROBSON, 1989), Vitro-Skin® (DIFFEY et al., 2000), placas ásperas de polimetilmetacrilato (PMMA) (COLIPA, 2007), Teflon (PTFE) (GAROLI et al., 2009) e placas de quartzo (AKRMAN et al., 2009). Este teste é baseado na determinação física e óptica da redução da energia na faixa do UV ocasionado por filme de fotoprotetor que tenha sido previamente espalhado em substrato adequado que por sua vez é sustentado por um suporte. A montagem recebe a amostra e é acoplada ao equipamento emissor de UVA e/ou UVB. Parte da radiação incidente é retida pelo filtro e parte é transmitida na forma de fótons e o cálculo do FPS da formulação teste é realizado conforme equação abaixo (**Equação 4**) (PISSAVINI et al., 2003; COLIPA, 2007; MATTS et al., 2010):

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E_{\lambda} \times I_{\lambda} \times d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E_{\lambda} \times I_{\lambda} \times T_{\lambda} \times d\lambda}$$

Equação 4

Sendo E_{λ} – energia necessária para causar eritema (CIE - *Commission International de l'Eclairage*, 1987) (MCKINLAY; DIFFEY, 1987); I_{λ} - intensidade da radiação UV emitida no comprimento de onda λ ; T_{λ} – transmitância espectral da amostra; d_{λ} – intervalo entre os comprimentos de onda (1 nm). As duas funções padronizadas, E_{λ} e I_{λ} , descrevem a sensibilidade relativa do eritema para comprimentos de onda individuais e a distribuição espectral da radiação solar, uma vez que atinge a superfície da Terra (DIFFEY; ROBSON, 1989; COLIPA, 2007; MATTS et al., 2010).

Outra opção para a determinação do FPUVB *in vitro* é a reprodução do método espectrofotométrico que se caracteriza pela leitura da absorção dos filtros solares através de amostras diluídas sob comprimentos de onda estabelecidos (DUTRA et al., 2004). Dentre estes, o método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al. (1986), a partir de dados padronizados por Sayre et al. (1979), se destaca pela boa correlação ao teste *in vivo*, além da agilidade e acessibilidade, já tendo sido utilizada em outros trabalhos (GARCIA; SANTOS, 1990; BARTH, 2000). A partir desta metodologia mede-se a absorbância de uma solução do filtro solar a concentração de 0,2 μ L/mL em solvente apropriado em vários comprimentos de onda (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm) e os resultados são aplicados na **Equação 5** (MANSUR et al., 1986).

$$FPS = FC \times \sum_{290nm}^{320nm} EE_{\lambda} \times I_{\lambda} \times Abs_{\lambda}$$

Equação 5

Sendo FC - fator de correção (igual a 10), determinado de acordo com dois filtros solares conhecidos e de tal forma que um creme contendo 8% de homossalato tenha FPS igual a 4,0; EE_{λ} - efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; I_{λ} - intensidade da radiação solar no comprimento de onda λ ; Abs_{λ} - leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar no comprimento de onda λ (MANSUR et al., 1986).

Os valores de $E_{\lambda} \times I_{\lambda}$ são constantes, como mostrados na **Tabela 6** (SAYRE et al., 1979).

Tabela 6 – Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação UVB em cada comprimento de onda.

UVB (λ nm)	EEλ x Iλ (Normalizado)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

Fonte: Adaptado de SAYRE et al., 1979.

Desta forma, o FPS estimado por espectrofotometria é um número que avalia o filtro de acordo com a altura, a largura e a localização da sua curva de absorção dentro do espectro de ultravioleta (MANSUR et al., 1986).

2.2.3.2 Fator de Proteção UVA (FPUVA)

Existem diversos métodos de avaliação da proteção UVA, tanto *in vivo* como *in vitro*. O principal método *in vivo* é o *Persistent Pigment Darkening* (PPD) que é recomendado pela Associação das Indústrias Cosméticas do Japão (JCIA). Ele se baseia na resposta de pigmentação tardia ou persistente da pele frente à radiação UVA (320-400 nm) após período de exposição de 2 a 4 horas à radiação simulada (15 J/cm²) (JCIA, 1995; MOYAL; CHARDON; KOLLIAS, 2000a, b). O PPD é a razão entre a dose mínima pigmentária (DMP) de radiação UVA requerida para produzir escurecimento pigmentário persistente da pele com bordas claramente definidas, observado entre 2 e 4 horas após a exposição à radiação UVA com e sem fotoprotetor na pele (**Equação 6**) (ANVISA, 2012a; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

$$FPUVA = \frac{DMP \text{ (pele fotoprottegida)}}{DMP \text{ (pele fotodesprotegida)}}$$

Equação 6

A Associação da Indústria Cosmética do Japão adotou o método PPD como método oficial para avaliação da eficácia UVA dos fotoprotetores desde janeiro de 1996 e avalia o FPS dos produtos conforme **Tabela 7** abaixo (JCIA, 1995):

Tabela 7 – Relação entre o grau de proteção UVA e o valor de PPD para fotoprotetores.

Valor de PPD	Grau de proteção UVA (FPUVA)	Classificação
0-2	-	Sem proteção UVA
2-4	PA+	Baixa proteção UVA
4-8	PA++	Moderada proteção UVA
8+	PA+++	Alta proteção UVA

Fonte: Adaptado de JCIA, 1995.

Esta metodologia também foi aceita pela Comunidade Europeia no qual se recomenda que o Fator de Proteção UVA (PPD) deve ser de no mínimo 1/3 do FPUVB declarado no rótulo do produto comercial (MOYAL; CHARDON; KOLLIAS, 2000a, b; JO, 2006; MOYAL, 2008).

Utiliza-se também o *Immediate Pigment Darkening* (IPD) que se baseia no escurecimento transiente da pele observado após a exposição à UVA. O IPD compreende as alterações da estrutura de melanócitos e queratinócitos, assim como a modificação da melanina pré-existente (ROUTABOUL; DENIS; VINCHE, 1999). O IPD progride em PPD, que é estável 2 horas após a exposição. O escurecimento da pele é uma das respostas imediatas, sendo considerada estável e reprodutível (JCIA, 1995; MOYAL; CHARDON; KOLLIAS, 2000a, b).

Recentemente, o FDA emitiu alguns documentos que abordam testes de eficácia e rotulagem de produtos fotoprotetores nos Estados Unidos intitulado “*Final Rule: Labeling and Effectiveness Testing*” no qual inclui critérios para avaliação do fator de proteção UVA (FDA, 2011). De acordo com este documento final, a partir do ano de 2012 produtos fotoprotetores contendo filtros UVA de curto, longo ou ambos espectros de absorções na faixa de 320 - 400 nm podem ser considerados de amplo espectro de ação para a radiação UV. Desta forma, o FDA aprovou a metodologia *in vitro* de determinação do comprimento de onda crítico (λ_c) como único método validado para a determinação do fator de proteção UVA (WANG; LIM, 2011).

A determinação do λ_c baseia-se na utilização da espectrofotometria com esfera de integração na faixa de 290 - 400 nm e o resultado corresponde ao valor de 90% da curva integral de absorção, ou seja, a área sob a curva entre os comprimentos de onda pré-estabelecidos como expressa a **Equação 7** (DIFFEY; ROBSON, 1989; COLE, 2001):

$$\int_{290\text{nm}}^{\lambda_c} A_{\lambda} \times d\lambda = 0,9 \times \int_{290\text{nm}}^{400\text{nm}} A_{\lambda} \times d\lambda \quad \text{Equação 7}$$

Sendo A_{λ} - absorvência do produto no comprimento de onda definido; d_{λ} - intervalo entre os comprimentos de onda (1 nm).

Produtos para proteção solar são então classificados como "amplo espectro", tendo parte de sua absorção no espectro UVA quando o comprimento de onda crítico é maior ou igual a 370 nm. Esta técnica tem sido objeto de avaliação pela COLIPA e grupos da indústria CTFA (COLE, 2001) e foi regulamentada pelo FDA por ser uma metodologia simples, barata e reproduzível (FDA, 2011).

2.2.4 Produtos Fotoprotetores

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o segmento cosmético brasileiro apresentou um crescimento médio deflacionado de 111,4% nos últimos 20 anos, passando de um faturamento líquido de imposto sobre venda de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 42,6 bilhões em 2015. O Brasil ocupa, atualmente, a primeira posição mundial em comercialização de protetores solares e a terceira posição no setor cosmético em geral. É responsável por cerca de 20% do consumo de fotoprotetores solares no mundo e 82% na América Latina. O segmento de proteção solar foi o que mais cresceu nos últimos anos graças à maior conscientização dos consumidores brasileiros em relação à proteção de sua pele contra as radiações UVB e UVA (ABIHPEC, 2016).

Preocupações com a prevenção do câncer de pele, além do fotoenvelhecimento ajudam a sustentar e fazer crescer o mercado de fotoprotetores que atualmente se aproxima de 1 bilhão de dólares somente nos Estados Unidos da América (EUA) (DATAMONITOR, 2014).

A ANVISA atualizou a classificação do protetor solar como sendo "qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação" (ANVISA, 2012a). As substâncias permitidas para uso como filtros solares estão listadas na Resolução RDC nº 47 de 16/03/2006. Este documento correlaciona 38 substâncias com suas respectivas

concentrações máximas de dosagem, onde, destas, 36 são compostos orgânicos (ANVISA, 2006).

Os produtos fotoprotetores devem apresentar na rotulagem principal o número inteiro de proteção solar precedido da sigla "FPS", ou das palavras "Fator de Proteção Solar", assim como constar da embalagem a Denominação de Categoria de Proteção (DCP), como demonstrado na **Tabela 8** (ANVISA, 2012a).

Tabela 8 - Designação de Categoria de Proteção (DCP) relativa à proteção oferecida pelo produto contra radiação UVB e UVA para a rotulagem dos protetores solares.

INDICAÇÕES ADICIONAIS NÃO OBRIGATORIAS NA ROTULAGEM	DCP	FPS medido	FPUVA mínimo	λ_c mínimo
Fototipo V	Baixa Proteção	6,0-14,9		
Fototipo IV e III	Média Proteção	15,0-29,9	1/3 do FPS indicado na rotulagem	370 nm
Fototipo II	Alta Proteção	30,0-50,0		
Fototipo I	Proteção Muito Alta	Maior que 50,0 e menor que 100		

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2012a.

De modo geral, para que o produto fotoprotetor apresente eficácia e segurança, o mesmo deve estar de acordo com os seguintes atributos:

- Absorção na faixa do UV deve estar entre 280 - 400 nm (ANVISA, 2012a);
- Possuir coeficiente de absorvidade molar (ϵ) acima de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SHAATH, 2007);
- Apresentar peso molecular superior a 500 Da para se prevenir a absorção percutânea (BOS; MEINARDI, 2000);
- Não ter o pico de absorção alterado por solventes (SHAATH, 2007);
- Ter baixa solubilidade em água (GIOKAS; SALVADOR; CHISVERT, 2007; SHAATH, 2007);
- Ser não tóxico, irritante e sensibilizante (ANVISA 2012b);
- Ter preço acessível e ser compatível com veículos cosméticos;
- Não deve descolorir ou manchar roupas; não cristalizar, ressecar a pele ou ter odor desagradável (ANVISA, 2012a).

Para explorar plenamente o potencial econômico, as indústrias de produtos fotoprotetores estão em busca de uma padronização mundial quanto à concentração de compostos fotoprotetores em produtos finais, uma vez que estas diferem

consideravelmente em todo o mundo. Na União Europeia a lista dos filtros permitidos em produtos cosméticos tem sido atualizada com regularidade nas últimas duas décadas, existindo atualmente 27 compostos absorvedores de radiação UV (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Na Austrália 30 fotoprotetores são aprovados (ARGOM, 2016). Em contrapartida, apenas 17 filtros estão listados na última monografia FDA nos EUA. Desde a criação do primeiro conjunto de regras em 1978, a FDA permitiu apenas a adição da avobenzona e do óxido de zinco como novos filtros solares (FDA, 2011) e está em andamento a avaliação de mais 8 ativos fotoprotetores (FDA, 2015).

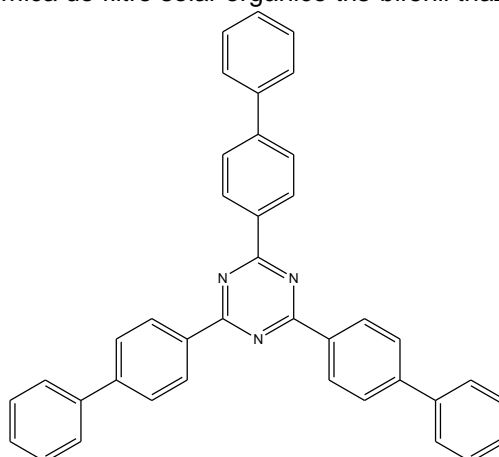
Nos EUA, os ativos de protetores solares são tratados como fármacos, sendo que o filtro solar somente pode ser registrado após um período mínimo de cinco anos de existência no mercado de cinco países estrangeiros. Após a experiência comercial, devem ser apresentados os dados de eficácia e segurança (FDA, 2011). Já nas agências regulatórias da Europa, América do Sul e Ásia os protetores solares são regulamentados como cosméticos e a aprovação é possível dentro de dois anos após a solicitação oficial (MANCERO; HU; WANG, 2014).

2.2.5 Fotoprotetores Orgânicos Inovadores

Os filtros ultravioletas tradicionais surgiram por volta da década de 1960 com a classe dos cinamatos e derivados do PABA, ambos de baixo peso molecular e comprovada absorção percutânea (SHAATH, 2007). O que requer constante monitoramento quanto à segurança, justificando uma tendência de investimento em pesquisas científicas no desenvolvimento de compostos orgânicos absorvedores de radiação UV eficazes, seguros e mais acessíveis através da síntese orgânica racionalizada (MANCERO; HU; WANG, 2014).

Nos últimos 14 anos, na Europa, foram lançados no mercado oito novos compostos fotoprotetores de peso molecular acima de 500 Da, cuja finalidade é diminuir a absorção percutânea (BOS; MEINARDI, 2000; TUCHINDA et al., 2006; SHAATH, 2010; COUTEAU et al., 2015). Destes, o composto tris-bifenil triazina - Tinosorb® A2B (**12**) (**Figura 14**) foi o primeiro filtro solar de amplo espectro de absorção no UV com peso molecular de 537 Da a ser adicionado no Anexo VI do *Cosmetics Regulation* (EC) n.1223/2009 do Parlamento Europeu que estabelece a lista de filtros que são autorizados em produtos cosméticos na Europa, uma vez que o regulamento entrou em vigor em julho de 2013 (COUTEAU et al., 2015).

Figura 14 – Estrutura química do filtro solar orgânico tris-bifenil triazina (**12**).



Fonte: CIBA, 2004.

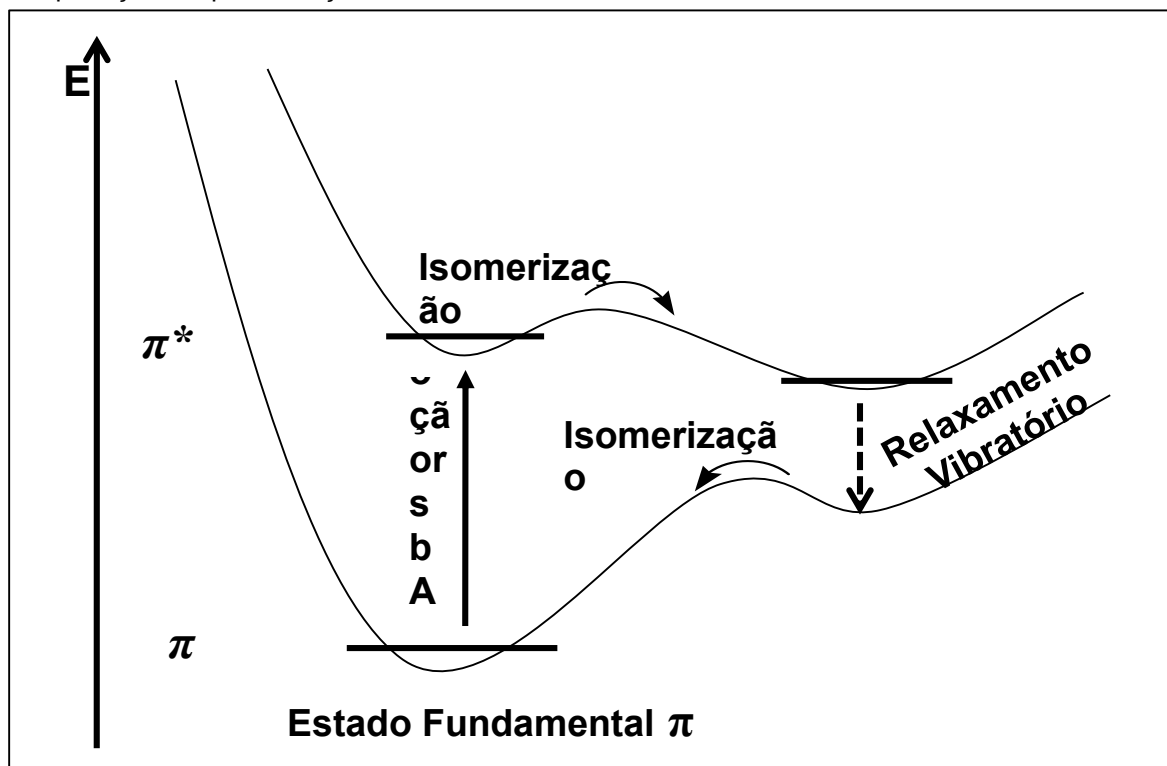
O composto tris-bifenil triazina (**12**) faz parte da classe das hidroxi-fenil-triazinas (HPTs) e assim como os filtros orgânicos da classe dos hidroxi-fenil-benzotriazóis (HBzTs) representam a mais avançada classe de absorvedores UV para fotoproteção de todos os tipos de substratos para teste de FPS e foram apresentados como filtros orgânicos na forma de pequenas partículas que aumentam a estabilidade da dispersão (0,05-1,0 μm). Estes compostos possuem múltiplos cromóforos com altos coeficientes de extinção específico (E) e amplo espectro de proteção contra as radiações UVB e UVA, simultaneamente (CIBA, 2004; HERZOG; HUEGLIN; OSTERWALDER, 2005; SHAATH, 2007; COUTEAU et al., 2015).

O produto comercial Tinosorb® M com o ativo denominado metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol – MBBT (**10**) faz parte dos fotoprotetores da classe dos hidroxi-fenil-benzotriazóis, possui peso molecular de 659 Da e $\lambda_{\text{máx}}$ em 305 nm (UVB) e em 360 nm (UVA I) (HERZOG; HUEGLIN; OSTERWALDER, 2005). Já o fotoprotetor Tinosorb® S - bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (BEMT) (**11**) compõem a classe das HPTs, possui peso molecular de 629 Da, é lipossolúvel com ponto de fusão igual a 80°C e cobre as radiações UVB e UVA, com $\lambda_{\text{máx}}$ de 310 e 342 nm, respectivamente (SHAATH, 2007). Ambos os ativos fotoprotetores foram desenvolvidos pela companhia CIBA *Specialty Chemicals*, Suíça. Suas partículas orgânicas são microfinas (100-200 nm), de modo que, além de absorver, também reflete e dispersa a radiação UV (CIBA, 2004; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005; TUCHINDA et al., 2006). Além disso, possuem peso molecular acima de 500 Da, conferindo-lhes menor capacidade de absorção percutânea e conseqüentemente, menor toxicidade cutânea, absorção sistêmica ou endócrina (TUCHINDA et al., 2006; GONZALEZ-PEREZ et al., 2007; PALM; O'DONOGHUE, 2007), com estudos

in vitro que relatam que estes tintosorbs não apresentam atividade estrogênica/antiestrogênica ou androgênica/antiandrogênica quando comparado a outros fotoprotetores (ASHBY et al., 2001; GIOKAS; SALVADOR; CHISVERT, 2007; GONZALEZ, 2010).

Tanto o MBBT (10) quanto o BEMT (11) apresentam elevada fotoestabilidade (DURÁN-GINER; ENCINAS; MIRANDA, 2013) como um resultado de suas estruturas moleculares que facilitam a dissipação de energia por transferência de calor incidente intramolecular e relaxamento vibracional (WAIBLINGER et al., 2001). Os dois grupos *orto*-OH, além de contribuírem para caracterizar o BEMT (11) como de amplo espectro, também permitem dissipação eficiente de energia por meio de ligações de hidrogênio intermolecular, no qual a radiação UV é convertida, quantitativamente, em energia vibratória (calor) (HERZOG; HUEGLIN; OSTERWALDER, 2005; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005) (**Figura 15**).

Figura 15 – Ciclo de conversão da energia UV em calor (cerca de 10^{-12} s), representando o modelo de proteção UV por absorção.



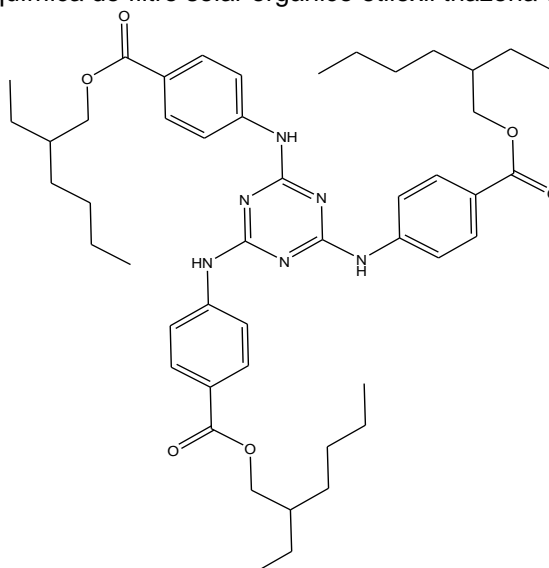
Fonte: Adaptado de ATKINS, 1994.

Todo o ciclo de dissipação de energia (**Figura 15**) possui período de duração por volta de 10^{-12} s, não havendo a formação de espécies reativas intermediárias e de produtos de decomposição fotolítica como oxigênio singlete ou radicais livres quando em contato com o as camadas cutâneas. Isso explica a fotoestabilidade do

BEMT (**11**), além de recuperação de mais de 95% após a irradiação UV de 50 doses eritemáticas mínimas (KECK et al., 1998; HERZOG; HUEGLIN; OSTERWALDER, 2005; KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

Assim como os fotoprotetores Tinosorb® A2B e Tinosorb® S, o filtro comercial Uvinul T150® - etilexil triazona (**13**) (**Figura 16**) também faz parte da classe das HPTs, possui peso molecular de 823 Da e $\lambda_{m\acute{a}x.}$ de 314 nm (HERZOG; HUEGLIN; OSTERWALDER, 2005). Mesmo agindo apenas na faixa da UVB é considerado um potente ativo absorvedor de radiação ultravioleta, até porque foi o primeiro filtro cuja estratégia de planejamento estrutural baseou-se na extensão e multiplicação de grupos cromóforos (BASF, 2002; SHAATH, 2007).

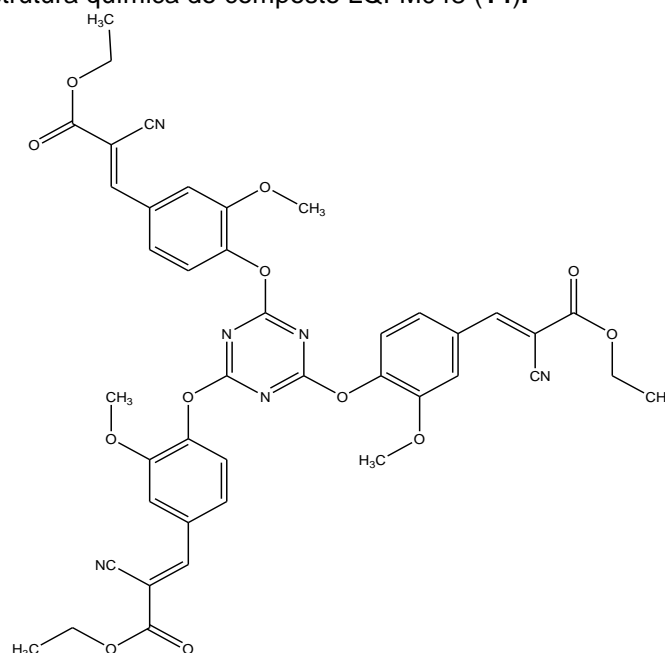
Figura 16 – Estrutura química do filtro solar orgânico etilexil triazona ou Uvinul T150® (**13**).



Fonte: CIBA, 2004.

Recentemente, o Uvinul T150® (**13**) foi empregado como protótipo por Vinhal e colaboradores (2016), no qual foi realizado o desenvolvimento racionalizado de um novo composto fotoprotetor orgânico 2,4,6-tris((*E*)-etil 2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato)-1,3,5-triazina – LQFM048 (**14**) (**Figura 17**). Este foi obtido em duas etapas sintéticas em rendimento global de 78%. Apresentou absorção na faixa da UVB ($\lambda_{m\acute{a}x.}$ = 306 nm) e da UVA I ($\lambda_{m\acute{a}x.}$ = 344 nm), simultaneamente; peso molecular de 816 Da, significativo coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon > 10^4$), termoestável em atmosfera de oxigênio, estável frente a potenciais de oxidação e redução (VINHAL et al., 2016). Além de mostrar-se fotoestável, seguro em modelos de cultura de células de fibroblastos *in vitro* e por via oral em modelos *in vivo* (VIEIRA, 2014; ÁVILA et al., 2016).

Figura 17 – Estrutura química do composto LQFM048 (**14**).



O estudo de novos compostos sintéticos requer protocolos que apresentem informações amplas e seguras a respeito dos candidatos a fotoprotetores orgânicos (MANCEBO; HU; WANG, 2014; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014). Desta forma, está em andamento a execução de ensaios de pureza, FPUVA e FPUVB *in vitro* e *in vivo*, absorção percutânea, imunossupressão, além do desenvolvimento de formulação envolvendo o LQFM048 (**14**).

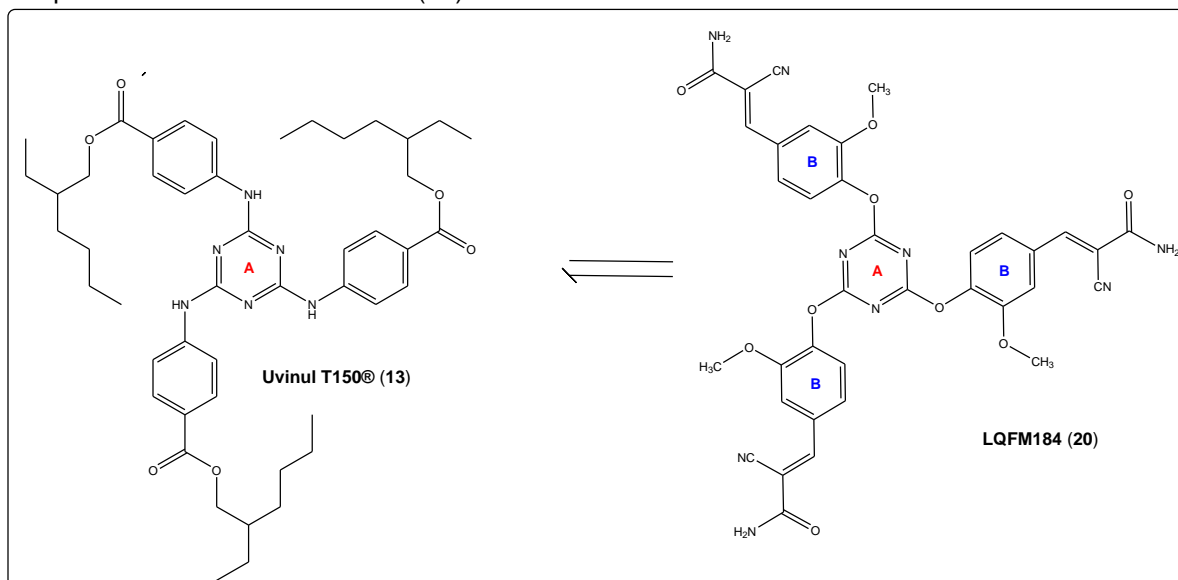
Em consonância com o êxito obtido por Vinhal e colaboradores (2016), o presente projeto tem por finalidade dar continuidade ao desenvolvimento de compostos candidatos a fotoprotetores inéditos, inovadores e seguros. Justificando-se por se apresentar como um vasto campo de atuação científica, visto sua documentada importância quanto à eficácia na profilaxia da carcinogênese e do fotoenvelhecimento (GILBERT et al., 2013; AAD, 2015; ACS, 2015; INCA, 2016). Além disso, há evidências do depósito de apenas 3% das 111 solicitações de patentes voltadas para a pesquisa de novos ativos absorvedores de radiação UV entre os anos de 1980 e 2008 (GUARATINI et al., 2009). Sendo que, os poucos ativos fotoprotetores comerciais das classes das HPTs e HBzTs desenvolvidos ainda apresentam elevados custos para o consumidor, pois são patenteados por grandes companhias como a BASF, CIBA, Merck e L'Oréal (SHAATH, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Planejar, sintetizar, caracterizar e avaliar um novo composto orgânico candidato a protótipo absorvedor de radiação ultravioleta - LQFM184 (**20**), originalmente desenhado a partir da semelhança estrutural com o fotoprotetor comercial etilexil triazona (Uvinul T150®) (**13**) (**Figura 18**).

Figura 18 – Planejamento estrutural do composto LQFM184 (**20**) a partir da análise retrossintética do composto comercial Uvinul T150® (**13**).



3.2 Objetivos Específicos

- I. Planejamento estrutural do composto LQFM184 (**20**);
- II. Síntese dos compostos precursores **17** e **18** e do composto objeto de estudos LQFM184 (**20**);
- III. Caracterização dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) através de métodos físicos usuais:
 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H Unidimensional e ^1H - ^{13}C Bidimensional;
 - Espectroscopia de Absorção no Infravermelho;
 - Espectrometria de Massas;
 - Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta;
 - Espectroscopia de Fluorescência;

IV. Avaliar o potencial redox dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) através de voltametria cíclica;

VI. Avaliar a degradação do composto LQFM184 (**20**) através de análise térmica termogravimétrica (TG);

VII. Estimar o FPUVB de uma solução contendo o composto LQFM184 (**20**) a partir do método espectrofotométrico *in vitro* proposto por Mansur e colaboradores;

VIII. Avaliar o perfil toxicológico *in vitro* do composto LQFM184 (**20**) através dos ensaios:

- Avaliação do potencial de irritação ocular através do ensaio de STE;
- Avaliação da citotoxicidade basal *in vitro* para estimar DL₅₀ através do método de captação do corante vermelho neutro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes

Os solventes e reagentes utilizados foram: hexano (C₆H₁₄), acetato de etila (AcOEt), clorofórmio (CHCl₃), acetona ((CH₃)₂CO), acetonitrila (CH₃CN), álcool etílico 95% (EtOH), álcool metílico (MeOH) e tolueno (C₇H₈), todos grau P.A.; acetato de cobre (II) [Cu(OAc)₂.H₂O], bicarbonato de sódio (NaHCO₃), carbonato de sódio (Na₂CO₃), cloreto de sódio (NaCl), ácido acético glacial (CH₃COOH), ácido clorídrico (HCl) e dimetilformamida (DMF), todos da marca Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil; morfolina (C₄H₁₁N), cloreto cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina) (C₃Cl₃N₃), brometo de potássio (KBr), malononitrila (C₃H₂N₂) todos da marca Acros Organics; clorofórmio deuterado (CDCl₃) e dimetilsulfóxido (DMSO), ambos da marca Cambridge Isotope Laboratories Inc (CIL); vanilina da Merck Company. Cloreto de Benzalcônio, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanossulfônico), penicilina G, tripsina/EDTA (0.025%:0.02%, p/v), todos da marca Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Soro bovino fetal, Células de proliferação ELISA, BrdU (colorimétrico) e kits Quantikine® ELISA human IL-18 BPa foram obtidos de Invitrogen, Life Technologies, Roche Applied Science e R&D Systems, respectivamente. Pen Strep® da Gibco, EUA.

A acidificação e neutralização, quando necessárias, foram efetuadas através do emprego de solução de HCl 10% (v/v) e solução de NaHCO₃ 10% (p/v). A neutralização foi monitorada com papel pHmetro da marca Merck Company.

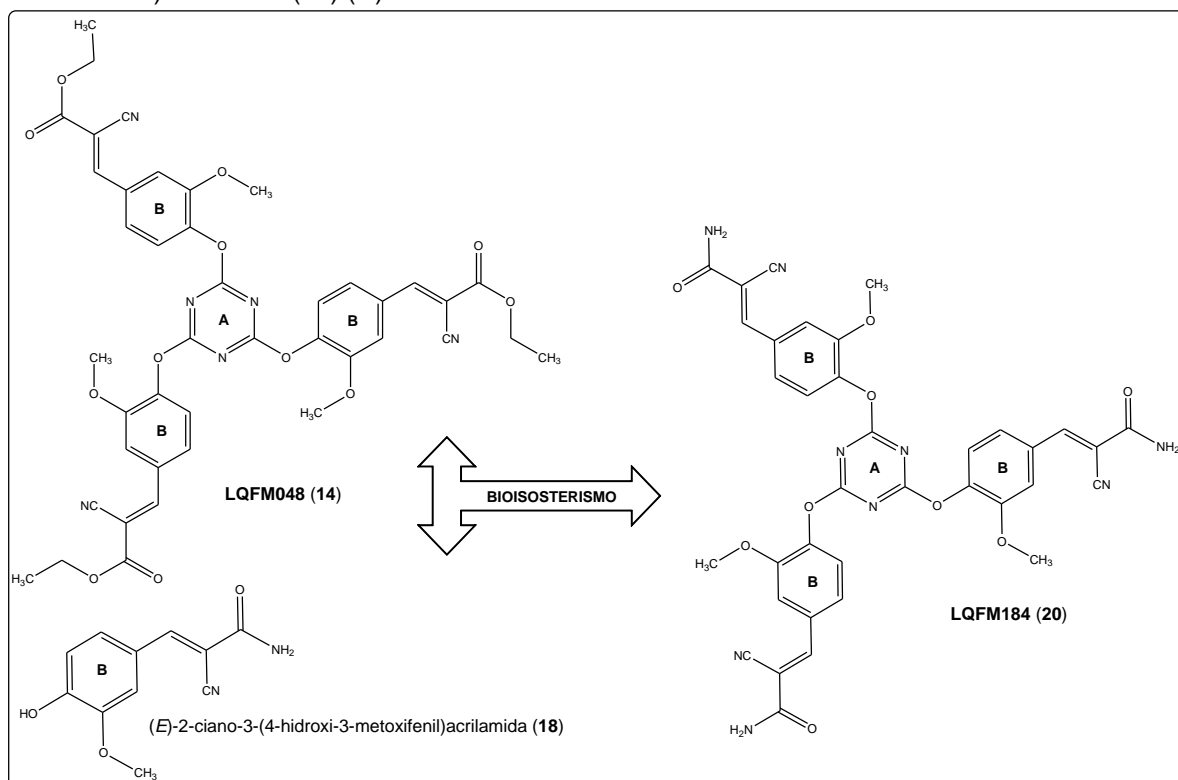
Quando necessário a vidraria foi seca em estufa à temperatura de 100°C, pelo período de 2 horas.

4.2 Planejamento Estrutural do Composto LQFM184 (20)

O projeto de um filtro solar eficiente, de amplo espectro de ação e com peso molecular acima de 500 Da foi baseado tanto na semelhança estrutural quanto na ação química de derivados triazínicos (**10**, **11** e **13**), cinâmicos (**4**) e do LQFM048 (**14**). No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento, a síntese, a caracterização estrutural e a avaliação toxicológica de compostos inovadores com perfil fotoprotetor, foi proposto o planejamento um novo composto candidato a protótipo absorvedor de radiação ultravioleta LQFM184 (**20**), originalmente desenhado através de estratégia de modificação racional, ou seja, de bioisosterismo

de anéis (PATANI; LAVOIE, 1996) entre o núcleo triazínico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (**19**)) (**A**), também chamado de cloreto cianúrico presente no protótipo LQFM048 (**14**) (VINHAL et al., 2016) e o derivado arilacrilamídico (**B**) – (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**), cuja síntese foi realizada através de abordagens de química verde (**Figura 19**).

Figura 19 – Bioisosterismo de anéis entre os compostos LQFM048 (**14**) (**A**) e (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**) (**B**).



A 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (**19**) é comumente empregada na síntese de compostos heterocíclicos, em especial os fotoprotetores (CIBA, 2001), devido à elevada reatividade dos átomos de cloro em relação aos nucleófilos, além de ser um reagente de baixo custo comercial (BLOTNY, 2006; REIS et al., 2013).

Desta forma, o (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**) substituiu os três átomos de cloro presentes no anel triazínico para formar o composto LQFM184 (**20**). O composto **18** foi escolhido para este trabalho devido sua semelhança estrutural com compostos da classe dos cinamatos (**4**), visto a comprovada importância deste grupo na absorção do UV (NASCIMENTO et al., 2014). Além disso, possui grupos cromóforos com ação fotoprotetora contra a UVA, semelhante ao composto comercial (*E*)-etil 2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato

patenteado pela Companhia Merck em 2007 (CHAUDHURI, 2007) e também estudado por Vinhal e colaboradores (2016).

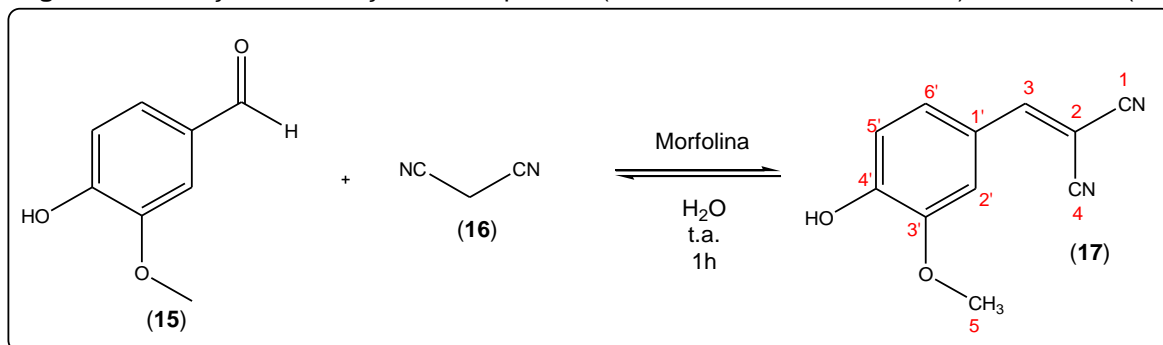
Para análise comparativa das características fotoprotetoras esperadas para o candidato a protótipo LQFM184 (**20**) utilizou-se dados dos compostos comerciais *para*-metoxinamato de octila (**4**), Tinosorb® M (**10**), Tinosorb® S (**11**) e Uvinul T150® (**13**) recolhidos da literatura.

4.3 Metodologia Sintética

4.3.1 Síntese do Composto 2-(4-Hidroxi-3-Metoxibenzilideno)Malononitrila (**17**) (GOMES et al., 2011)

Em um Bécker de 50 mL foram adicionados 3,28 mmol de vanilina (**15**), 3,28 mmol de malononitrila (**16**), 5,0 mL de água destilada e 1 gota de morfolina. A suspensão foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Ao término o precipitado foi filtrado à vácuo e o produto obtido foi mantido em dessecador para a retirada da umidade (**Figura 20**).

Figura 20 – Reação de obtenção do composto 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**).



Foram obtidos 0,185 g (92 %) de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**) (C₁₁H₈N₂O₂), como um pó amarelo; P.M. = 200,19; P.F. = 131°C; R.f. = 0,9 em CH₂Cl₂:MeOH (95:5 v/v) e 0,6 em hexano:AcOEt (70:30 v/v).

RMN ¹H (500,13 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 8,27 (1H, s, H-3); 7,63 (1H, d, *J* = 2,05 Hz, H-2'); 7,50 (1H, dd, *J* = 2,05 e 8,35 Hz, H-6'); 6,98 (1H, d, *J* = 8,35 Hz, H-5'); 3,80 (3H, s, OCH₃).

HSQC e HMBC (125,76 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 115,5(1C, C-1); 148,4 (1C, C-2); 160,8 (1C, C-3); 113,3(1C, C-4); 55,6 (1C, CH₃); 154,1 (1C, C-1'); 113,6 (1C, C-2'); 148,2 (1C, C-3'); 123,5 (1C, C-4'); 116,1 (1C, C-5'); 127,8 (1C, C-6').

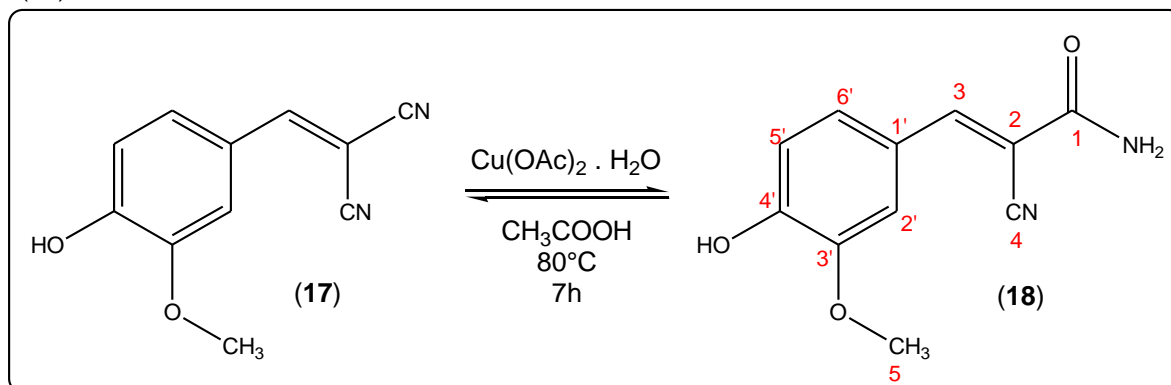
IV máx. (KBr) cm⁻¹: 3400 - 3300 (ν OH); 2951 (ν CH₃); 2236 (ν CN); 2220 (ν CN).

EM: [(M - H)⁻, *m/z* = 199.05122].

4.3.2 Síntese do Composto (*E*)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida (18) (XIN et al., 2013)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 1 mmol de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (17), 0,1 mmol de Cu(OAc)₂ · H₂O, 0,2 mL de água destilada e 10 mL de CH₃COOH. A temperatura foi gradualmente elevada até 80°C e a mistura reacional foi mantida sob refluxo por 7 horas. A mistura foi tratada com solução saturada de NaCl e o precipitado formado foi filtrado em bomba a vácuo (Figura 21).

Figura 21 – Reação de obtenção do composto (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18).



Foram obtidos 0,202 g (93%) de (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18) (C₁₁H₁₀N₂O₃), como um pó amarelo esverdeado; P.M. = 218,2; P.F. = 205°C; R.f. = 0,5 em CH₂Cl₂:MeOH (95:5 v/v) e 0,1 em hexano:AcOEt (70:30 v/v).

RMN ¹H (500,13 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 8,05 (1H, s, H-3); 7,66 (1H, d, *J* = 2,06 Hz, H-2'); 7,45 (1H, dd, *J* = 2,06 e 8,31 Hz, H-6'); 6,93 (1H, d, *J* = 8,31 Hz, H-5'); 3,80 (3H, s, OCH₃).

HSQC e HMBC (125,76 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 163,8 (1C, C-1); 113,6 (1C, C-2); 151,0 (1C, C-3); 117,6 (1C, C-4); 55,8 (1C, CH₃); 126,1 (1C, C-1'); 113,4 (1C, C-2'); 151,7 (1C, C-3'); 148,3 (1C, C-4'); 116,5 (1C, C-5'); 126,3 (1C, C-6').

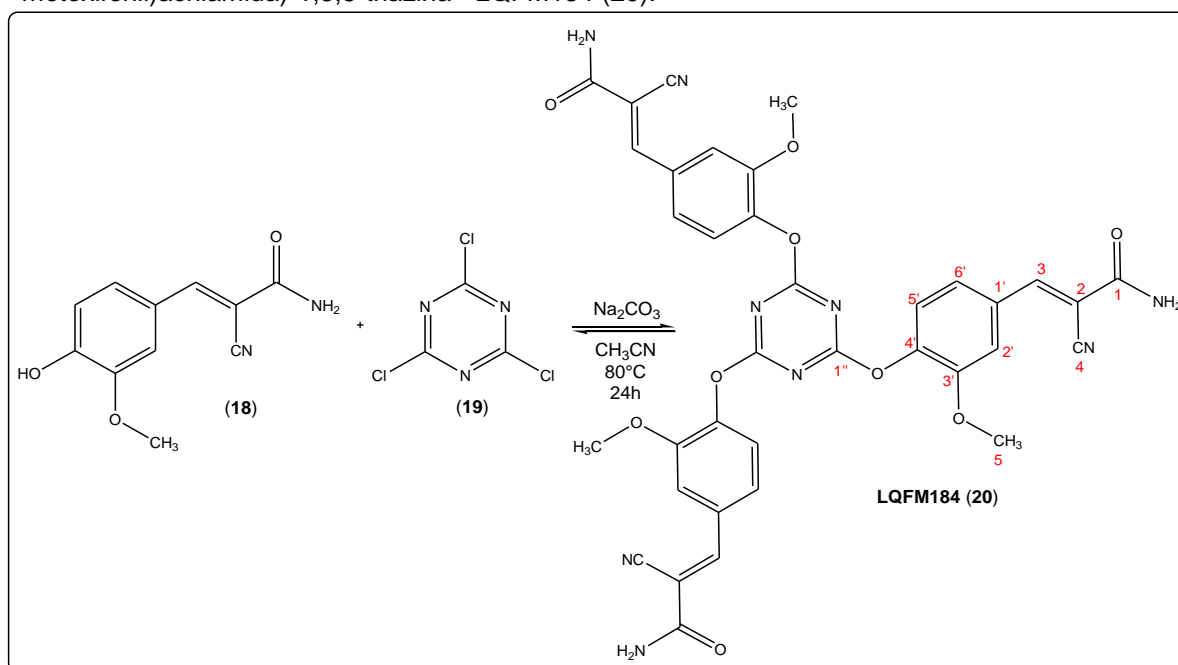
IV máx. (KBr) cm⁻¹: 3474 (ν NH); 3465 (ν NH); 3400 - 3300 (ν OH); 2211 (ν CN); 1683 (ν C=O).

EM: [(M - H)⁻, *m/z* = 217.06177].

4.3.3 Síntese do Composto 2,4,6-Tris((*E*)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida)-1,3,5-Triazina - LQFM184 (20) (MENICAGLI et al., 2004; DUAN et al, 2011)

Em um balão contendo uma mistura de 3,5 mmol de (*E*)-etil 2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilato (18), 3,5 mmol de Na₂CO₃ e 5,0 mL de acetonitrila, ambos sob agitação, foi adicionado solução de 1,0 mmol de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (19) em 5,0 mL de acetonitrila. A temperatura foi gradualmente elevada até 80°C e a mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 24 horas. O solvente foi removido à pressão reduzida, a mistura foi solubilizada em DMF procedendo-se à recristalização em solução aquosa acidificada com CH₃COOH (Figura 22).

Figura 22 – Reação de obtenção do composto 2,4,6-tris((*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida)-1,3,5-triazina - LQFM184 (20).



Foram obtidos 0,450 g (62%) de 2,4,6-tris((*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida)-1,3,5-triazina - LQFM184 (20) - (C₃₆H₂₇N₉O₉), como um pó branco amarelado; P.M. = 729,65; P.F. = 147°C; R.f. = 0,2 em CH₂Cl₂:MeOH (95:5 v/v) e 0,1 em hexano:AcOEt (70:30 v/v).

RMN ¹H (500,13 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 8,20 (1H, s, H-3); 7,70 (1H, d, *J* = 1,68 Hz, H-2'); 7,60 (1H, dd, *J* = 1,68 e 8,34 Hz, H-6'); 7,40 (1H, d, *J* = 8,34 Hz, H-5'); 3,80 (3H, s, OCH₃).

HSQC e HMBC (125,76 MHz) CDCl₃/TMS (δ): 162,5 (1C, C-1); 107,0(1C, C-2); 150,0 (1C, C-3); 116,4 (1C, C-4); 56,0 (1C, CH₃); 123,2 (1C, C-1'); 114,3 (1C, C-2'); 150,7 (1C, C-3'); 142,5 (1C, C-4'); 131,2 (1C, C-5'); 123,0 (1C, C-6'); 172,8 (1C, C-1").

IV máx. (KBr) cm⁻¹: 3290 (ν NH); 3275 (ν NH); 2937 (ν CH₃); 2218 (ν CN); 1692 (ν C=O).

EM: [(M + H)⁺, m/z = 730.20082].

4.4 Experimental

4.4.1 Métodos Cromatográficos

Para o monitoramento das reações utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD) com placas cromatográficas de alumínio da marca Whatman® AL SIL G/UV fluorescente em ultravioleta no comprimento de onda 254 (UV₂₅₄), 0,2 mm de espessura empregando-se como fase móvel CH₂Cl₂:MeOH (95:5 v/v) e hexano:AcOEt (70:30 v/v). As visualizações em cromatografia de camada delgada foram realizadas em lâmpada de ultravioleta 254 e 365 nm.

4.4.2 Medidas do Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Gehaka Modelo PF1500, no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia - UFG.

4.4.3 Métodos Espectroscópicos

4.4.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H Unidimensional e ¹H-¹³C Bidimensional

Os compostos sintetizados foram caracterizados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para isso, espectros de RMN de ¹H Unidimensional e ¹H-¹³C Bidimensionais (HSQC e HMBC) foram obtidos no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ/UFG) em espectrômetro BRUKER – AVANCE III 500 de 11.75 Tesla, operando a 500,13 MHz (frequência do hidrogênio) e equipado com os seguintes acessórios:

- Sonda multinuclear para tubo de 5 mm de diâmetro com detecção inversa e gradiente de campo no eixo z;

- Sonda multinuclear para tubo de 5 mm de diâmetro com detecção direta e gradiente de campo no eixo z;
- Unidade de temperatura variável.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm. Na aquisição destes espectros foram utilizados CDCl_3 e Tetrametilsilano (TMS). Utilizou-se como referência interna o sinal do TMS. Os espectros foram tabulados na ordem dos números de núcleos, multiplicidade (s, simpleto; d, duplete; dd, duplo duplete; q, quarteto; t, tripleto) e a constante de acoplamento (J) em Hz.

4.4.3.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (CA/IQ/UFG) no espectrômetro de infravermelho, Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-FIR Spectrometer, com as frequências de absorção expressas em cm^{-1} . As amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr).

4.4.3.3 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas (EM) foram adquiridos no Laboratório de Caracterização do Petróleo (LabPetro) da Universidade Federal do Espírito Santo (LabPetro - UFES) em equipamento FT-ICR MS BRUKER 9,4T, operando no modo de ionização por *electrospray* (ESI). Os dados foram processados em um software Compass SolariX Control 1.5.0 103 (28 fev de 2011) Bruker Daltonics, Breker, Alemanha, Data analysis 4.0 SP 4.

A taxa de aquisição do aparelho foi ajustada para a obtenção de uma varredura por segundo com intervalos de 0,4 s. Os dados obtidos foram expressos de 90 a 1000 íons baseado em sua razão massa/carga (m/z) em potencial elétrico negativo. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: injeção do gás de nebulização do qual foi configurada para 500 L/h até a temperatura de 140°C ; o fluxo de gás foi definido para 50 L/h; e a temperatura da fonte foi configurada para atingir 100°C . A tensão capilar e a tensão do fluxo foram definidas para 4.500 V e 25 V, respectivamente.

As análises foram adquiridas utilizando *Iso Spray Voltage* e padrão interno para garantir precisão na obtenção da massa. As soluções amostra foram preparadas: 5,0 mg da amostra foi dissolvida em 10 mL de tolueno. Um volume de 0,5 mL desta

solução foi transferido para um *vial* de 1,0 mL de metanol contendo 0,2% de hidróxido de amônia para análises no modo negativo. As análises foram realizadas por infusão direta em um fluxo de 5,0 µL/min., sendo que dois tipos de ionização foram utilizados: modo positivo [M + H]⁺, [M + Na]⁺ ou modo negativo [M - H]⁻.

4.4.3.4 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta

Para cálculo dos parâmetros comprimento de onda máximo ($\lambda_{máx.}$) e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) mediu-se a absorbância em triplicata de uma solução do composto LQFM184 (**20**).

Para a construção da curva de calibração (Absorbância x Concentração) foram preparadas soluções nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75, 100 e 200 µM contendo o composto objeto de estudos LQFM184 (**20**) utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. como solvente (ISAAC et al., 2005; SHAATH, 2007).

Soluções dos compostos **17** e **18**, foram preparadas sob as mesmas condições e solubilizadas em clorofórmio P.A. e DMSO, respectivamente. As leituras foram realizadas em triplicata na faixa do UV de 250 a 450 nm e os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{máx.}$) foram obtidos no Laboratório de Fotofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG) em espectrofotômetro UV-Vis U-2900 Spectrophotometer on COM1 – Hitachi, com cubeta de quartzo de 2,0 mm x 10 mm (ISAAC et al., 2005). Foram construídas curvas espectrais das soluções dos compostos **17** e **18** para efeito comparativo à curva do composto LQFM184 (**20**).

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) foi calculado conforme **Equação 8**:

$$\epsilon = \frac{Abs_{\lambda}}{b \times c} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo ϵ – coeficiente de absorvidade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) característico do filtro UV; Abs_{λ} - absorbância no $\lambda_{máx.}$; b – distância percorrida pelo feixe de radiação através da amostra (cm); c – concentração do filtro UV na solução (mol/L).

4.4.3.5 Espectroscopia de Fluorescência

A partir das soluções preparadas para os ensaios de espectrofotometria no UV puderam-se realizar as leituras espectrofotométricas de fluorescência. Estas foram realizadas no Laboratório de Fotofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG) em Fluorímetro FL solutions F-7000 FL

Spectrophotometer on USB – Hitachi. Utilizou-se cubeta de quartzo de 2,0 mm x 10 mm e os solventes foram clorofórmio P.A. para o composto **17** e DMSO para os compostos **18** e LQFM184 (**20**). As leituras foram realizadas em triplicata sendo os compostos excitados na faixa de absorção conforme o comportamento de cada um no UV.

4.4.4 Avaliação do Potencial Redox por Voltametria Cíclica

Para as medidas voltamétricas foram usados três eletrodos: (i) de trabalho, sendo eletrodos de pasta de carbono modificados (EPC) com as amostras dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) (60 mg grafite, 5 mg da amostra e 20 mg de óleo mineral), em cuja superfície ocorrem processos redox envolvendo os constituintes do analito; (ii) de referência de calomelano (ECS), cujo potencial é mantido, à medida que o potencial aplicado sobre o eletrodo de trabalho varia; (iii) e o eletrodo auxiliar de espiral de platina, o qual, sendo um material condutor, possibilita que o fluxo da carga ao longo do tempo seja apenas entre este eletrodo e o de trabalho. Isto contribui para que o potencial do eletrodo de referência se mantenha constante, evitando a ocorrência de processos com os constituintes do eletrodo de referência.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato μ AUTOLAB Type III® da Eco-Chemie (Holanda) acoplado ao software GPES versão 4.9 para aquisição de dados; conectado a uma célula eletroquímica com sistema de três eletrodos pertencente ao Laboratório de Análises Farmacêuticas e Ambientais da Faculdade de Farmácia (LAFAM/UFG).

As medidas eletroquímicas foram feitas através de voltametria cíclica, utilizando-se como eletrólito suporte solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0; velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; faixa de varredura de -0,25 a 1,25 V.

Para ajuste do pH da solução tampão fosfato utilizou-se pHmetro da marca Logen modelo LSPHS 25CW com eletrodo de vidro universal da marca Eltex.

4.4.5 Avaliação da Degradação por Análise Térmica Termogravimétrica

Para a avaliação da estabilidade térmica, por volta de 1,0 a 5,0 mg de amostra do composto LQFM184 (**20**) em cadinho de alumina, foi submetido à atmosfera de ar sintético em fluxo de 50 mL/min., em aparelho Shimadzu com detector DTG-60 H pertencente à Central Analítica do Instituto de Química – UFG. Seguiu-se uma rampa de aquecimento que iniciou em 5°C e variou de 5°C/min. até 700°C em ar sintético

de forma a tentar reproduzir o aquecimento que o composto LQFM184 (**20**) sofreria no uso cotidiano ou na produção industrial.

Esta rampa apresenta três ciclos de aquecimento e resfriamento, para tal reproduzir uma exposição prolongada. Ao passo que cada um dos ciclos cobre um período de aproximadamente 7 horas, considerando intervalos de extrema incidência de radiação solar.

A partir da obtenção da rampa térmica proposta, construiu-se o gráfico termogravimétrico (TG) ao qual podem ser analisadas alterações físicas ou químicas sofridas pelo composto LQFM184 (**20**) em função da temperatura e do tempo (IONASHIRO, 1999).

4.4.6 Determinação do FPUVB através do método espectrofotométrico *in vitro* proposto por Mansur e colaboradores

Para a determinação do FPUVB do fotoprotetor aqui proposto LQFM184 (**20**), utilizou-se o método *in vitro* espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (MANSUR et al., 1986) e utilizado por outros autores (GARCIA; SANTOS, 1990; BARTH, 2000; RIBEIRO, 2004).

Pesou-se 10,0 mg do composto LQFM184 (**20**) do qual foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL, contendo cerca de 5,0 mL de DMSO P.A. (ISAAC et al., 2005); solubilizou-se e completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se uma alíquota de 0,01 mL para balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se o volume com o mesmo solvente. A concentração final obtida foi de $1,3 \times 10^{-5}$ M, que é a concentração padronizada para o cálculo do FPS. A solução padrão *para*-metoxicinamato de octila (**4**) foi preparada sob as mesmas condições.

A análise foi realizada em triplicata e as absorbâncias das soluções da amostra LQFM184 (**20**) e do padrão *para*-metoxicinamato de octila (**4**) foram obtidas no Laboratório de Fotofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF/UFG) em espectrofotômetro UV-Vis U-2900 Spectrophotometer on COM1 – Hitachi, com cubeta de quartzo de 2,0 mm x 10 mm, usando DMSO P.A. como branco, com intervalos de leitura de 5,0 nm (ISAAC et al., 2005) e o espectro foi registrado na faixa entre 250 a 400 nm (RIBEIRO, 2004).

O FPS médio foi calculado através da **Equação 5** (Cálculo do FPS segundo MANSUR et al., 1986). Os valores de E_{λ} x I_{λ} são constantes e estão dispostos na **Tabela 6** (SAYRE et al.,1979). Construiu-se curva ponderal do valor relativo da absorção *versus* comprimento de onda para o composto padrão *para*-metoxicinamato de octila (**4**) (MANSUR et al., 1986).

4.4.7 Determinação do perfil toxicológico *in vitro*

4.4.7.1 Avaliação do potencial de irritação ocular do através do ensaio de STE

A avaliação do potencial de irritação ocular do composto LQFM184 (**20**) foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – LFTC da Faculdade de Farmácia – UFG, utilizando o ensaio *Short Time Exposure* (STE), conforme o guia *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) nº 491 (OECD, 2015).

O ensaio de citotoxicidade STE avalia a viabilidade de células de córnea de coelho SIRC após 5 minutos de exposição ao composto-teste, para identificar e classificar compostos químicos que induzem lesões oculares graves ou irritação ocular conforme sistema de classificação da *United Nations Globally Harmonized System for Classification* (UM GHS) (OECD, 2015).

No presente estudo, as células SIRC, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil), foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, glutamina (2 mM), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanossulfônico) (4,5 mM), bicarbonato de sódio (170 mM) e penicilina G (100 U/mL) em estufa de cultura celular (37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade). Para a remoção das células dos frascos de cultivo celular, utilizou-se solução de tripsina/ EDTA (0,025%:0,02%, p/v).

No ensaio STE, as células SIRC (3,0 x 10³ células/poço) foram semeadas em placas de microtitulação de 96 poços e incubadas por cinco dias. Em seguida, as células foram expostas por 5 minutos a concentrações de 5,0 e 0,05% (p/p) de soluções dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) (200 µL/poço). Em paralelo, grupos de células também foram incubados com cloreto de benzalcônio (controle positivo), solução-veículo do controle positivo (salina tamponada com fosfato - PBS) ou solução-veículo dos compostos-teste (5,0% de DMSO em PBS). Posteriormente, cada poço foi lavado duas vezes com 200 µL de tampão PBS seguido pela adição

de 200 µL de solução de sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio – MTT] (0,5 mg/mL em meio de cultura). Após duas horas, os cristais de formazana formados foram extraídos pela adição de DMSO (200 µL/poço) e a absorbância medida a 560 nm utilizando espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan® Spectrum (MA, EUA). Os valores de densidade óptica obtidos para cada composto-teste foram usados para calcular a viabilidade celular relativa ao controle negativo, considerado como 100% de viabilidade celular.

O potencial de irritação ocular foi classificado de acordo com a viabilidade celular de cada composto, conforme **Tabela 9**.

Tabela 9 - Modelo de predição de irritação ocular pelo ensaio STE conforme OECD 491.

Viabilidade Celular		Classificação UN GHS
5%	0,05%	
> 70%	> 70%	Sem categoria
≤ 70%	> 70%	Nenhuma predição pode ser feita
≤ 70%	≤ 70%	Categoria 1

Fonte: Adaptado de OECD, 2015.

4.4.7.2 Avaliação da citotoxicidade basal *in vitro* para estimar DL₅₀ através do método de captação do corante vermelho neutro

A avaliação da citotoxicidade com células 3T3 para estimar a dose letal aguda 50% (DL₅₀) do composto LQFM184 (**20**) foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – LFTC da Faculdade de Farmácia – UFG, utilizando o método de captação do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina), conforme o *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), 2006.

O ensaio de citotoxicidade basal *in vitro* utilizando o método de captação do corante vermelho neutro avalia a viabilidade de células 3T3 após 3 horas de exposição a diferentes concentrações do composto-teste. O procedimento baseia-se na capacidade das células viáveis de se incorporar e ligar ao corante vermelho neutro, uma vez que a morte celular ou inibição do crescimento das células diminui a quantidade de vermelho neutro retido pela cultura de 3T3 (ICCVAM, 2006).

Neste estudo foram utilizados a linhagem de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3-A31 (ICCVAM,2006) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil). Foram cultivados dentro de garrafas plásticas (75 cm²) em meio

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibiótico Pen Strep® (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) em estufa de cultura celular (5% CO₂, 37°C, 90% de umidade). A manutenção das células foi realizada através de repiques periódicos (três vezes por semana) e para a remoção das células das garrafas de cultivo utilizou-se solução de tripsina/EDTA (0.025%:0.02%, p/v) diluída em salina tamponada de fosfato (*phosphate buffered saline* - PBS) (1:1) quando a confluência celular atingiu cerca de 70-80%. Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o contador celular automático TC20™ (Bio-Rad, CA, EUA) para realização dos ensaios, os quais foram conduzidos se a viabilidade era superior a 90%.

As células 3T3 (3 x 10³ células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa celular. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram tratadas com 8 diferentes concentrações da LQFM184 (**20**) (1,6-200 µg/mL), diluídas em meio completo, por 48 h. Grupos de células controle (apenas meio de cultura) e veículo do composto LQFM184 (**20**) (0,12% de DMSO em DMEM) foram incluídos assim como grupos brancos sem células (meio de cultura ou LQFM184 (**20**) diluído em meio de cultura) **Figura 23**.

Figura 23 – Microplaca de 96 poços semeada com células 3T3 para o teste de citotoxicidade *in vitro* do LQFM184 (**20**) nas concentrações de 1,6; 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL. O LQFM184 (**20**) foi solubilizado totalmente em DMSO e as diluições foram feitas em DMEM suplementado com 10% de SFB. DMSO 0,12% (veículo) também foi exposto às células do controle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Meio	Meio	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Meio
B	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
C	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
D	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
E	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
F	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
G	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
H	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
I	Meio	Controle	1,6 µg/mL	3,1 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	Veículo	Meio
J	Meio	Meio	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Meio

Ao término do tempo de incubação de 48 h, a placa foi lavada duas vezes com PBS (100 µL/poço) e a solução de corante vermelho neutro em DMEM (25 µg/mL) foi adicionada em cada poço (200 µL/poço). Após 3 h de incubação, o sobrenadante foi descartado, a placa lavada novamente com PBS e a solução de fixação (100 µL/poço) (1% ácido acético glacial:50% etanol:49% água ultrapura) foi adicionada em cada poço. A placa foi agitada mecanicamente por 20 minutos e a absorbância medida a 545 nm em espectrofotômetro Multiskan Spectrum Thermo Scientific®, MA, EUA. A viabilidade celular para cada concentração de LQFM184 (**20**) foi obtida conforme a **Equação 8**:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{Grupo\ Tratado - Branco}{Grupo\ Controle - Branco} \times 100$$

Equação 8

A partir dos valores de viabilidade celular, a concentração que promoveu inibição do crescimento celular em 50% das células tratadas quando comparado as células controle não tratadas (CI_{50}) foi determinada e utilizada para estimar a dose letal mediana - DL_{50} (mg/kg) a partir da **Equação 9** (VIEIRA et al., 2011):

$$\log(DL_{50}) = 0,545 \times \log(CI_{50}) + 0,757$$

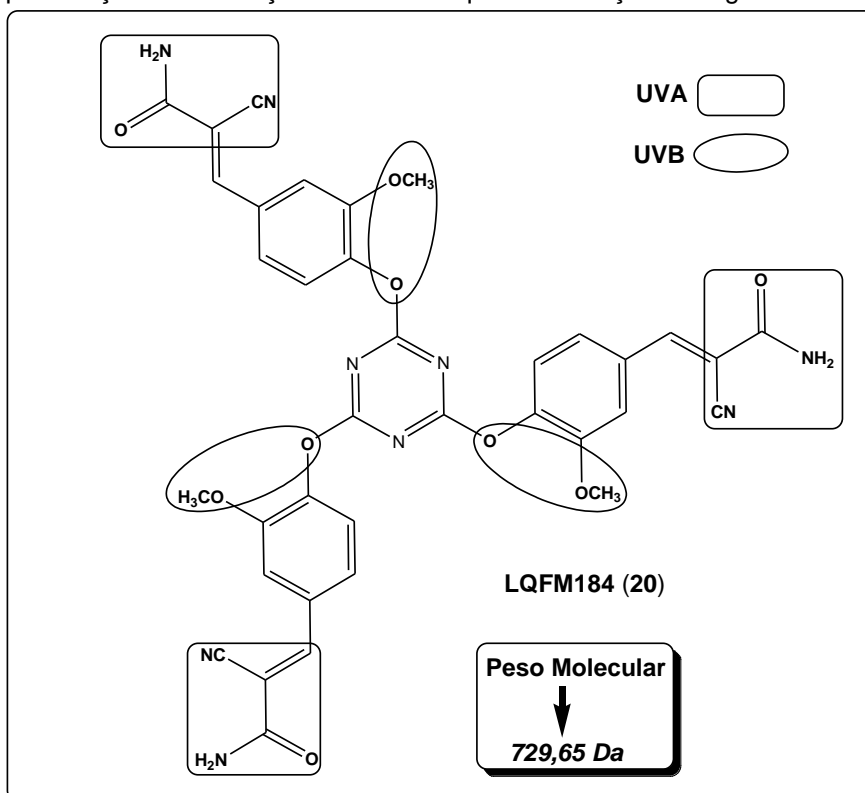
Equação 9

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composto candidato a protótipo fotoprotetor orgânico - LQFM184 (20)

Como consequência de sua estrutura molecular, o derivado triazínico LQFM184 (20) pode ser caracterizado como composto absorvedor da radiação UV na faixa da UVB e da UVA, assim como os fotoprotetores comerciais Tinosorb® M (10) e Tinosorb® S (11). Isso se deve à presença de cromóforos que aumentam ($R-O-R$; $-OCH_3$) e que diminuem ($-CN$; $-R-CO-NH_2$) a densidade eletrônica do sistema aromático, constituindo um sistema conjugado de amplo espectro de absorção da radiação UV. Tal processo é identificado pela ocorrência de transições eletrônicas com fortes momentos bipolares, ambas polarizadas perpendicularmente uma a outra (Figura 24).

Figura 24 – Estrutura molecular do composto candidato a protótipo fotoprotetor LQFM184 (20) com indicação da polarização das transições com consequente absorção na região da UVA e UVB.



Visando conseguir um composto que apresente amplo espectro de absorção no UV, além de peso molecular acima de 500 Da, foi introduzido o (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (18) em substituição aos três grupos cloretos presentes no anel triazínico para formar o composto LQFM184 (20), no qual apresentou-se como composto de peso molecular de 729,65 Da, que de acordo com

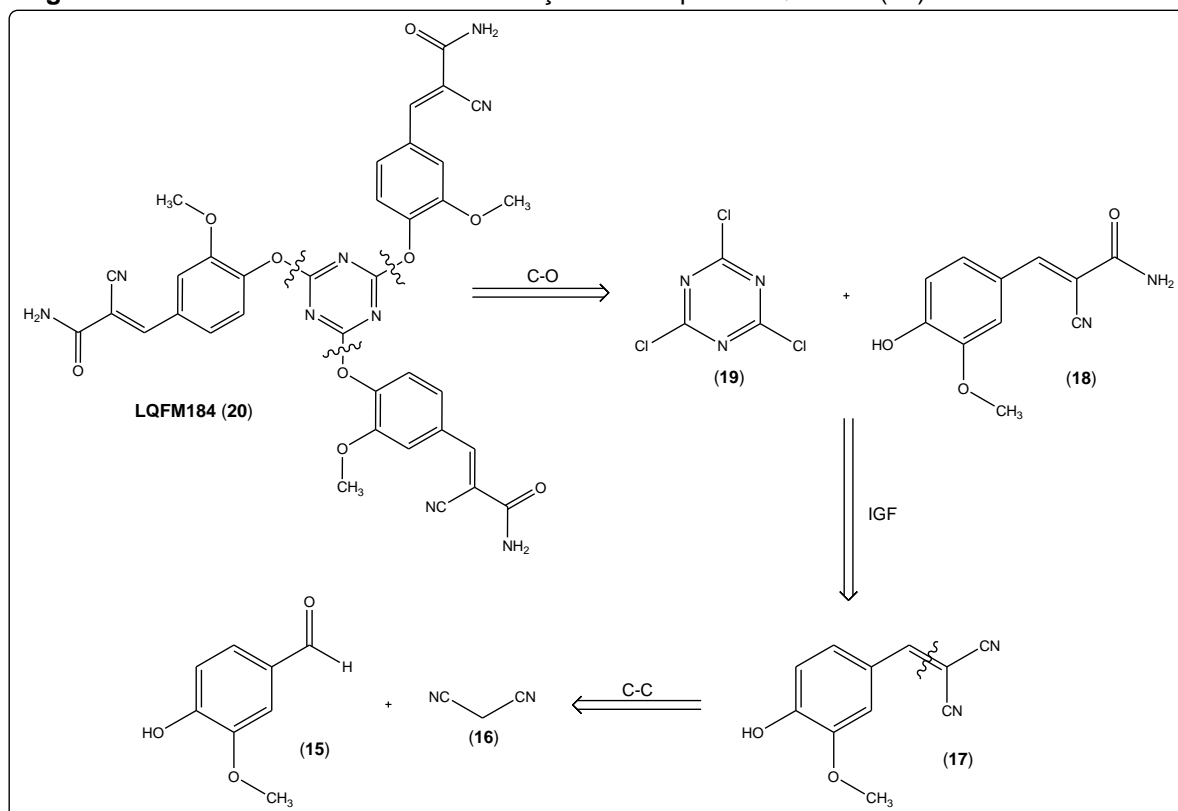
alguns autores dificulta a absorção percutânea (BOS; MEINARDI, 2000; TUCHINDA et al., 2006; SHAATH, 2010).

De modo geral, o planejamento de um filtro solar orgânico eficiente LQFM184 (**20**), de amplo espectro e com peso molecular acima de 500 Da foi baseado na semelhança estrutural e na ação química dos derivados triazínicos (**10**, **11** e **13**), cinâmicos (**4**) e LQFM048 (**14**). Este último foi sintetizado e patenteado por Vinhal e colaboradores (2016), e apresenta comprovadas características fotoprotetoras.

5.2 Análise Retrossintética

Através da análise retrossintética proposta por Warren e Wyatt (2008), ilustrada na **Figura 25**, observa-se que o composto LQFM184 (**20**) pode ser obtido a partir de três desconexões sucessivas C-O, a partir dos compostos 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (**19**) e (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**). Por sua vez, o composto **18**, pode ser obtido de uma interconversão de grupos funcionais (IGF) a partir do composto 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**). A obtenção do composto **17** ocorre através de uma desconexão C-C, tendo como matérias de partida vanilina (**15**) e malononitrila (**16**).

Figura 25 – Análise retrossintética de obtenção do composto LQFM184 (**20**).



5.3 Propostas Mecanísticas

5.3.1 Composto 2-(4-Hidroxi-3-Metoxibenzilideno)Malononitrila (17)

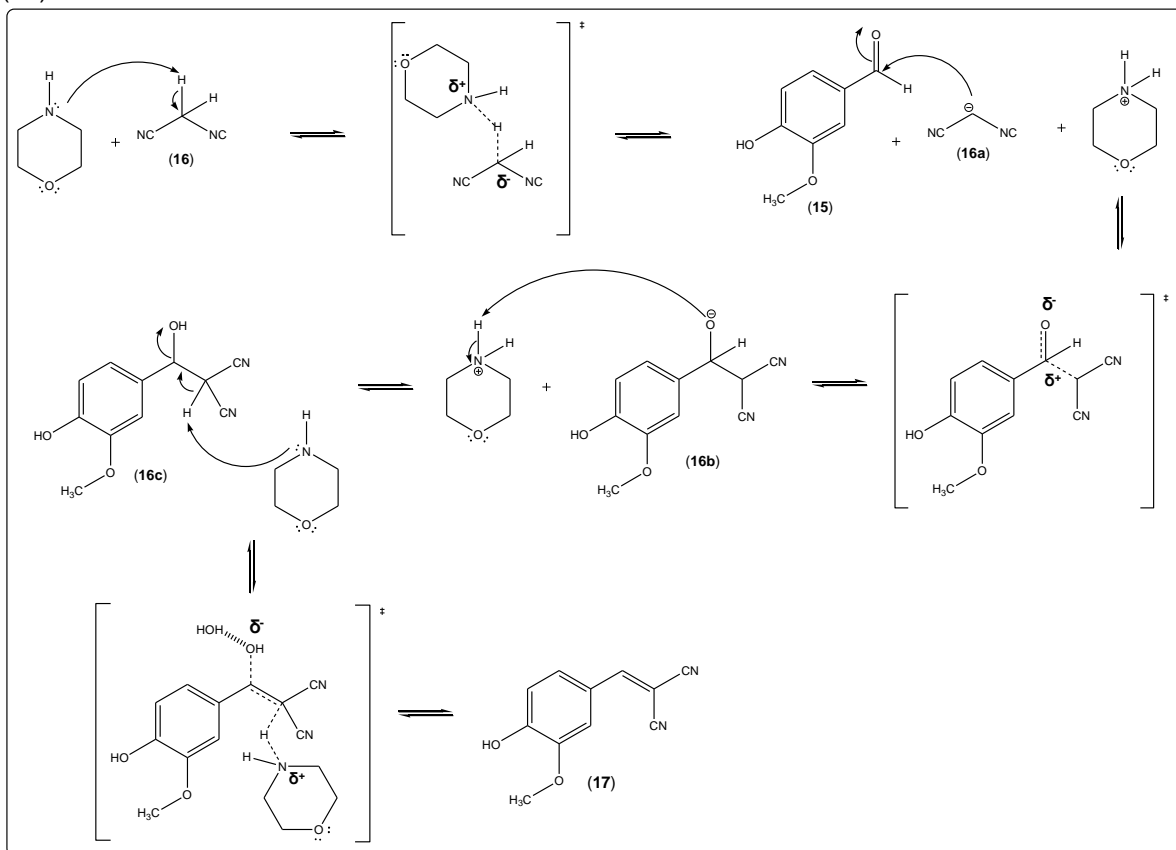
O início da rota sintética se deu pela reação de condensação da vanilina (**13**) com a malononitrila (**16**) em meio aquoso, catalisado por morfolina, à temperatura ambiente e agitação, levando à obtenção de 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**) após uma hora, em rendimento de 92% (**Figura 20**) (GOMES et al., 2011).

O mecanismo da reação de Knoevenagel se dá através de duas etapas principais, sendo a primeira de adição e a segunda de eliminação, com sucessivas etapas de transferência de prótons (KNOEVENAGEL, 1894; SMITH; MARCH, 2001). Usualmente, a reação de Knoevenagel faz uso das modificações de Doebner, a qual emprega piperidina como catalisador, piridina como solvente, durante seis horas, sob temperatura de refluxo (DOEBNER, 1900). No entanto, recentemente em nosso grupo, foi descrito a condensação de aldeídos aromáticos com cianoacetato de etila, empregando morfolina como catalisador e água como solvente, à temperatura ambiente (GOMES et al., 2011). O efeito hidrofóbico da água induz a dispersão dos compostos orgânicos em meio aquoso sob forma de micelas (BRESLOW, 1991). Devido às interações de hidrogênio da água, bem como da sua maior densidade em relação aos compostos orgânicos, a mesma aumenta a pressão do sistema, comprimindo os compostos orgânicos presentes nas micelas uns contra os outros, o que acaba por favorecer as reações intermoleculares (MENEGATTI, 2012). Neste sentido, podemos concluir que o efeito da água em reações orgânicas se dá através do aumento da pressão da reação, aumentando a velocidade da mesma.

Antes da etapa de adição, o catalisador morfolina abstrai um próton metilênico da malononitrila (**16**), levando à formação do intermediário carbânion (**16a**), que se caracteriza por ser um melhor nucleófilo, quando comparado a **16**. Na sequência, o intermediário **16a** se adiciona à subunidade carbonila da vanilina (**15**), levando à formação do intermediário de adição **16b**, além da morfolina protonada. Na próxima etapa, o intermediário alcoolato (**16b**) abstrai um dos prótons da morfolina protonada, levando à formação do intermediário álcool (**16c**) mais o catalisador morfolina. Para a próxima etapa da reação, duas possibilidades mecanísticas para a eliminação da subunidade hidroxila são possíveis, ou seja, eliminação por etapas ou concertada. Na eliminação por etapas, após a abstração do próton metilênico

(16c) a morfolina protonada teria um dos seus prótons abstraídos pela subunidade hidroxila, a qual seria eliminada durante a formação da dupla ligação. Na eliminação concertada, ao mesmo tempo em que o próton estaria sendo abstraído pela morfolina, o solvente (H₂O) assistiria à eliminação do íon hidróxido, sendo este último o mecanismo mais provável devido ao meio de alta constante dielétrica (**Figura 26**).

Figura 26 – Mecanismo de formação do composto 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**).



Vale salientar que a rota sintética acima segue alguns princípios de química verde por não utilizar solventes orgânicos, bem como ausência de aquecimento, além de reagentes de fontes renováveis, *i.e.* da vanilina **17** a qual é obtida à partir de fontes naturais, uma vez que é extraída de uma espécie de orquídea chamada *Vanilla planifolia* (BYTHROW, 2005).

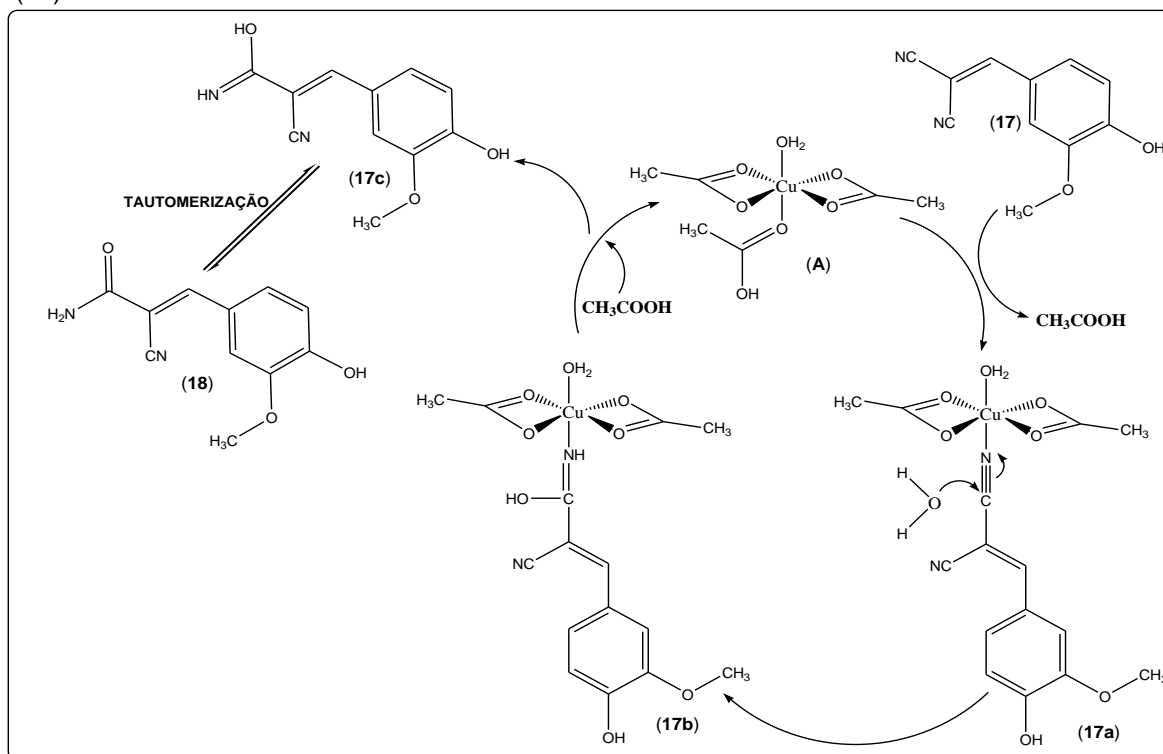
5.3.2 Composto (*E*)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida (**18**)

A reação de formação do composto **18** deu-se pela hidratação da 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**) em meio contendo ácido acético (CH₃COOH) e acetato de cobre II [Cu(OAc)₂.H₂O], à temperatura de refluxo de 80°C, levando à

obtenção do produto com rendimento de 93% após 7 horas de reação (**Figura 21**) (XIN et al., 2013).

O mecanismo da reação de hidratação de nitrilas ocorre, inicialmente, pela formação de um complexo **A** entre o $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2% de água em meio contendo ácido acético (**Figura 27**). A hidratação tem início a partir da coordenação do 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**) ao centro divalente do complexo **A**, formando então o intermediário **17a** (SHARROCK; MELNÍK, 1985). Este processo de coordenação ao centro divalente do complexo **A** é favorecido por ambos os efeitos eletrônicos e alostéricos apresentados pelos grupos metoxila presentes no composto **17** (KUDER et al., 1977). Por conseguinte, o ataque nucleofílico da água ao carbono da nitrila do intermediário **17a** favorece a formação do intermediário **17b**. Este por sua vez, um iminol, sofre tautomerização, ou seja, os dois produtos formados, a monoamida **18**, ficam em equilíbrio químico dinâmico após a regeneração do complexo **A** (**Figura 27**).

Figura 27 – Mecanismo de formação do composto (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**).

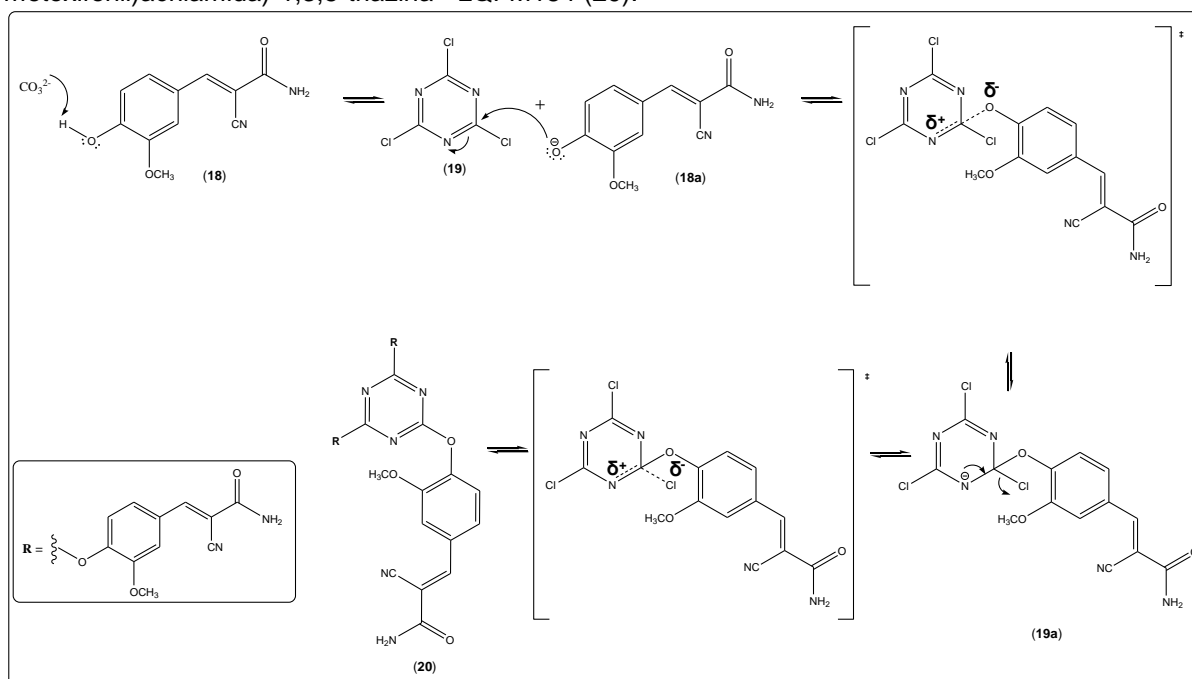


5.3.3 Composto 2,4,6-Tris((*E*)-2-Ciano-3-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)Acrilamida)-1,3,5-Triazina - LQFM184 (20)

A síntese do composto LQFM184 (20), se deu através da reação de substituição nucleofílica aromática, a partir da reação entre o intermediário **18** com o composto 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (19) em meio contendo Na₂CO₃ e acetonitrila, à temperatura de refluxo, levando à formação do produto em 62% após 24 horas de reação (Figura 22) (MENICAGLI et al., 2004).

Como pode ser observado na Figura 28, a formação do produto LQFM184 (20) ocorre através de uma etapa de adição seguida de uma etapa de eliminação, permeada por sucessivas etapas de transferência de prótons. Inicialmente, ocorre a abstração do próton fenólico (18) pela base carbonato, uma vez que o fenolato (18a) é melhor nucleófilo quando comparado ao fenol (18). O fenolato (18a), por sua vez, se adiciona ao átomo de carbono sp² do composto triazínico (19), levando à formação do intermediário de adição (19a). Na próxima etapa, o par de elétrons sobre o átomo de nitrogênio restitui a aromaticidade do heterociclo triazínico através da eliminação do átomo de cloro, levando à obtenção do composto objeto de estudo LQFM184 (20) após este processo ter ocorrido três vezes consecutivas (MENICAGLI et al., 2004; DUAN et al., 2011).

Figura 28 – Mecanismo de formação do composto 2,4,6-tris((*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida)-1,3,5-triazina - LQFM184 (20).

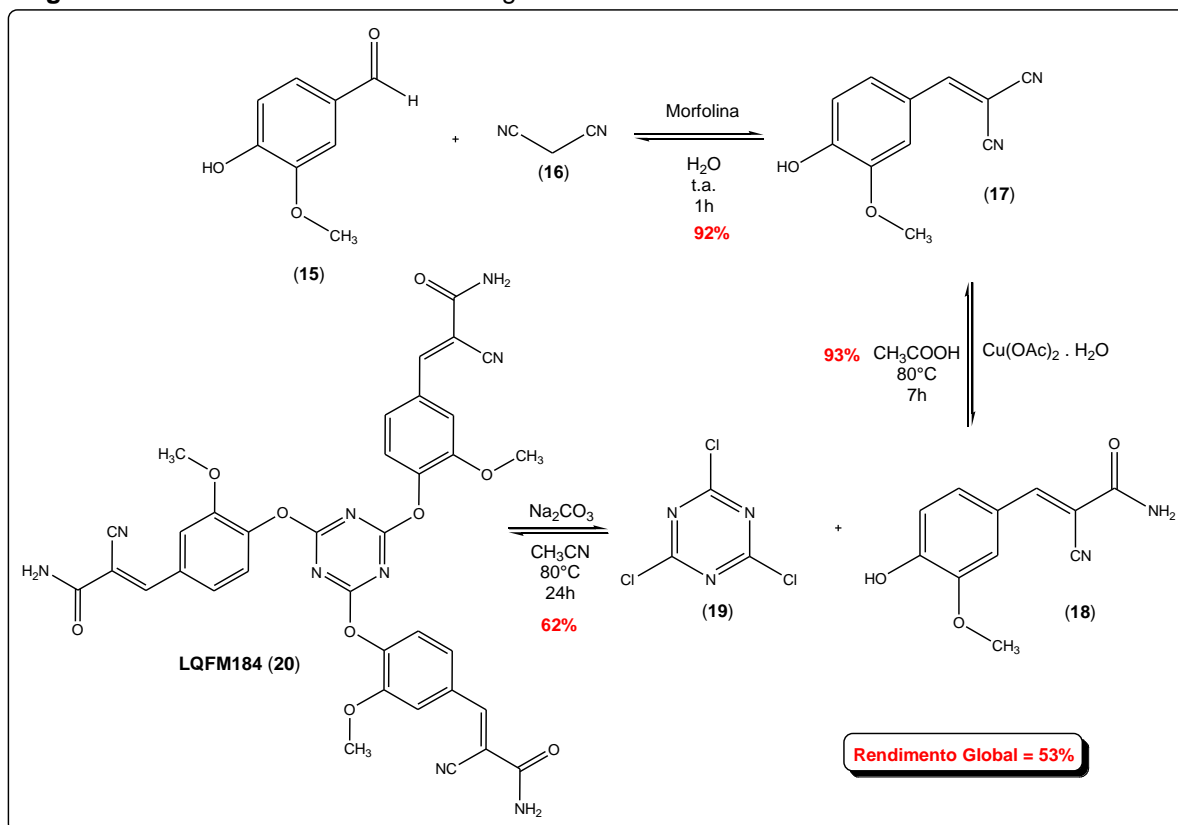


Existe facilidade do deslocamento dos átomos de cloro presentes no cloreto cianúrico (**19**) por vários nucleófilos, sendo que na presença de um aceptor de prótons (K_2CO_3 ou Na_2CO_3), este reagente torna-se eficaz na preparação de 1,3,5-triazinas mono-, di- e tri-substituídas. Além disso, a substituição do cloro pode ser controlada pela temperatura, no qual a monossustituição do cloro ocorre abaixo ou a $0^\circ C$, a dissustituição à temperatura ambiente e a trissustituição acima de $60^\circ C$ (BLOTNY, 2006). Desta forma, as condições, ideais, relacionadas à síntese orgânica do composto LQFM184 (**20**) foram semelhantes aos protocolos preconizados para os fotoprotetores comerciais Tinosorb® M (**10**), Tinosorb® S (**11**) e Ulvinul T150® (**13**) (CIBA, 2004).

5.4 Rota Sintética

De modo geral, a rota sintética é composta por três reações e mostrou-se adequada, perfazendo rendimento global satisfatório de 53%, sendo realizadas sob o âmbito da química verde. Ressalta-se que não foi realizada extração com solventes orgânicos em nenhuma das etapas reacionais, pois ambos os compostos sofreram recristalização em meio aquoso, ao passo que na primeira etapa utiliza-se água como solvente, cujo rendimento é de 92% para o composto **17**. A partir da segunda reação obteve-se o composto **18** com rendimento de 93%, seguida pela reação de obtenção do composto LQFM184 (**20**) com um rendimento de 62%, semelhante ao apresentado na obtenção dos ativos fotoprotetores comerciais Tinosorb® M (**10**), Tinosorb® S (**11**) e Ulvinul T150® (**13**) (CIBA, 2004), no qual foi obtido por recristalização em meio ácido (**Figura 29**).

Figura 29 – Rota sintética e rendimento global.



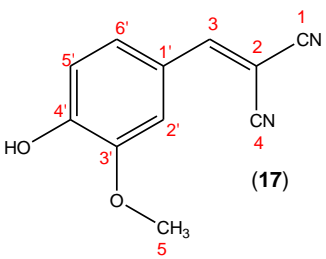
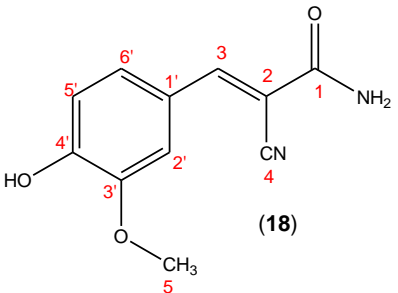
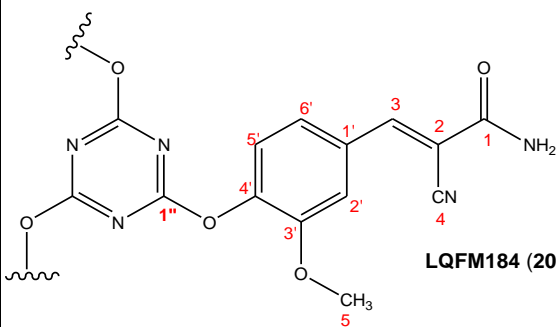
A rota sintética do LQFM184 (20) apresenta relevância significativa quanto à ausência de solventes aromáticos ou halogenados, sendo que estes solventes apresentam resíduos de difícil remoção no produto final e sua utilização é inadequada em produtos de aplicação cosmética.

5.5 Caracterização estrutural dos compostos sintetizados através de métodos espectroscópicos

5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H Unidimensional e ^1H ^{13}C Bidimensional

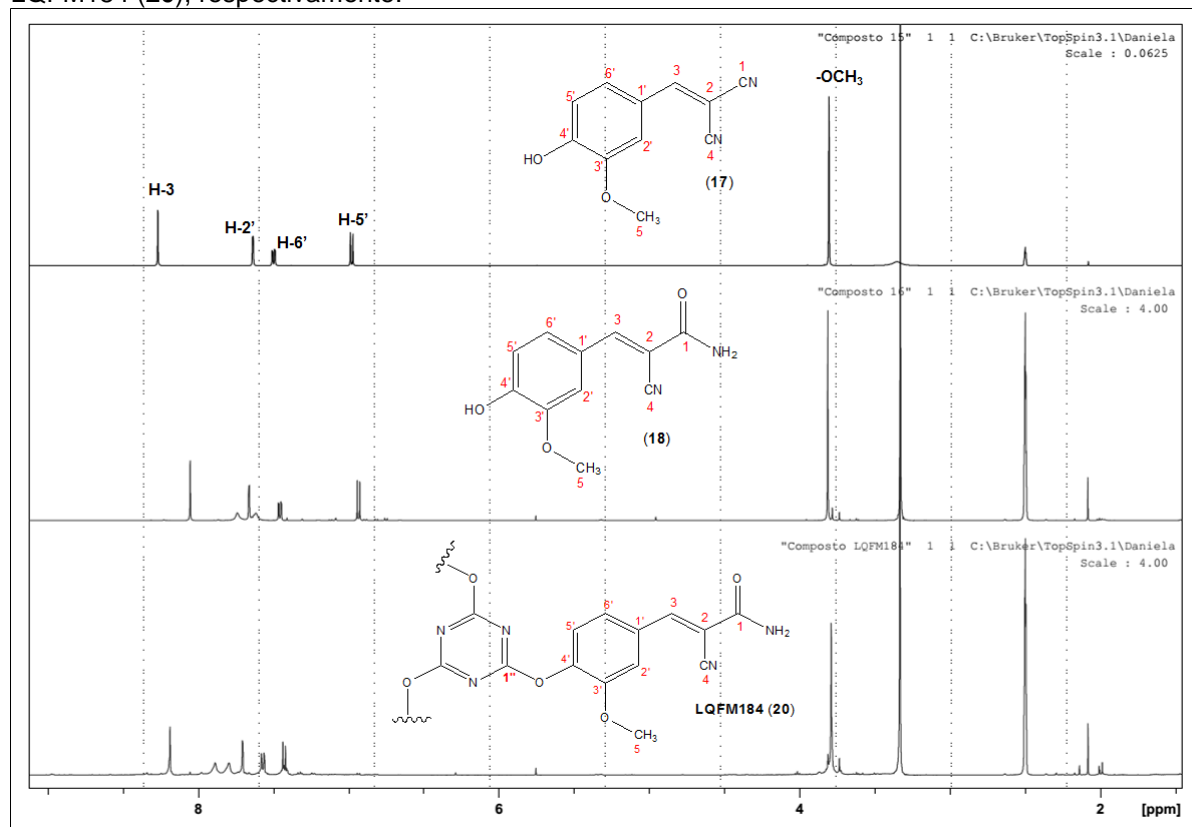
A completa atribuição dos hidrogênios e carbonos para os compostos 17, 18 e LQFM184 (20) se encontra na Tabela 10, assim como a sobreposição dos espectros na Figura 30. A partir destes dados pode-se observar a concretização reacional para formação do composto 20 pela diferença de deslocamentos entre os hidrogênios atribuídos.

Tabela 10 - Atribuição dos átomos de hidrogênios e carbonos para os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**), através de RMN ^1H unidimensional e ^1H e ^{13}C bidimensional.

 <p>(17)</p>	n°	^1H	^{13}C
	1	-	115,5
	2	-	148,4
	3	8,27 (1H, s)	160,8
	4	-	113,3
	5	3,80 (3H, s)	55,6
	1'	-	154,1
	2'	7,63 (1H, d, $J = 2,05$ Hz)	113,6
	3'	-	148,2
	4'	-	123,5
	5'	6,98 (1H, d, $J = 8,35$ Hz)	116,1
6'	7,50 (1H, dd, $J = 2,05$ e $8,35$ Hz)	127,8	
 <p>(18)</p>	n°	^1H	^{13}C
	1	-	163,8
	2	-	113,6
	3	8,05 (1H, s)	151,0
	4	-	117,6
	5	3,80 (3H, s)	55,8
	1'	-	126,1
	2'	7,66 (1H, d, $J = 2,06$ Hz)	113,4
	3'	-	151,7
	4'	-	148,3
	5'	6,93 (1H, d, $J = 8,31$ Hz)	116,5
6'	7,45 (1H, dd, $J = 2,06$ e $8,31$ Hz)	126,3	
 <p>LQFM184 (20)</p>	n°	^1H	^{13}C
	1	-	162,5
	2	-	107,0
	3	8,20 (1H, s)	150,0
	4	-	116,4
	5	3,80 (3H, s)	56,0
	1'	-	123,2
	2'	7,70 (1H, d, $J = 1,68$ Hz)	114,3
	3'	-	150,7
	4'	-	142,5
	5'	7,40 (1H, d, $J = 8,34$ Hz)	131,2
6'	7,60 (1H, dd, $J = 1,68$ e $8,34$ Hz)	123,0	
1''	-	172,8	

Como ilustrado na **Figura 30**, para ambos os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) o átomo de hidrogênio 3 é o que se apresenta mais desblindado, pois além de ocupar a posição β em relação à subunidade carbonila α,β -insaturada, também se encontra vizinho à fenila. Por não acoplar com outros átomos de hidrogênio, o mesmo se apresenta como simpleto. Na sequência, o átomo de hidrogênio 2' é o mais desblindado devido ao efeito de anisotropia diamagnética, uma vez que se encontra próximo à subunidade α,β -insaturada e metoxila, seguido dos hidrogênios 6' e 5'.

Figura 30 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H unidimensional dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**), respectivamente.



Quando observamos a subunidade fenila, identificamos três átomos de hidrogênios aromáticos, que variam apenas quanto aos seus deslocamentos químicos, face aos diferentes ambientes químicos, mas o padrão de multiplicidade é igual para ambos. Neste sentido, o átomo de hidrogênio H-2' se apresenta como duplete com $J = 2,05, 2,06$ e $1,68$ Hz, para **17**, **18** e LQFM184 (**20**), respectivamente, característico de acoplamento *meta* com H-6'. Por sua vez, o H-5' se apresenta como duplete com $J = 8,35, 8,31$ e $8,34$ Hz, para ambos **17**, **18** e LQFM184 (**20**), característico de acoplamento *orto* com H-6'. Por fim, o H-6' se apresenta como um duplo duplete com $J = 2,05$ e $8,35$ Hz; $J = 2,06$ e $8,31$ Hz, bem como $J = 1,68$ e $8,34$ Hz, para **17**, **18** e LQFM184 (**20**) respectivamente, característico de acoplamento *meta* e *orto* com H-2' e H-5'.

A **Figura 30** apresenta forte indício de formação do composto LQFM184 (**20**), devido à presença da hidroxila apenas nos compostos **17** e **18**. Além disso, o átomo de H-5' se encontra mais desblindado $\delta = 7,40$ quando comparado ao mesmo hidrogênio dos compostos **17** e **18**, com $\delta = 6,98$ e $6,93$, respectivamente. Este fato pode ser explicado pela maior proximidade de H-5' ao sistema 1,3,5-triazínico

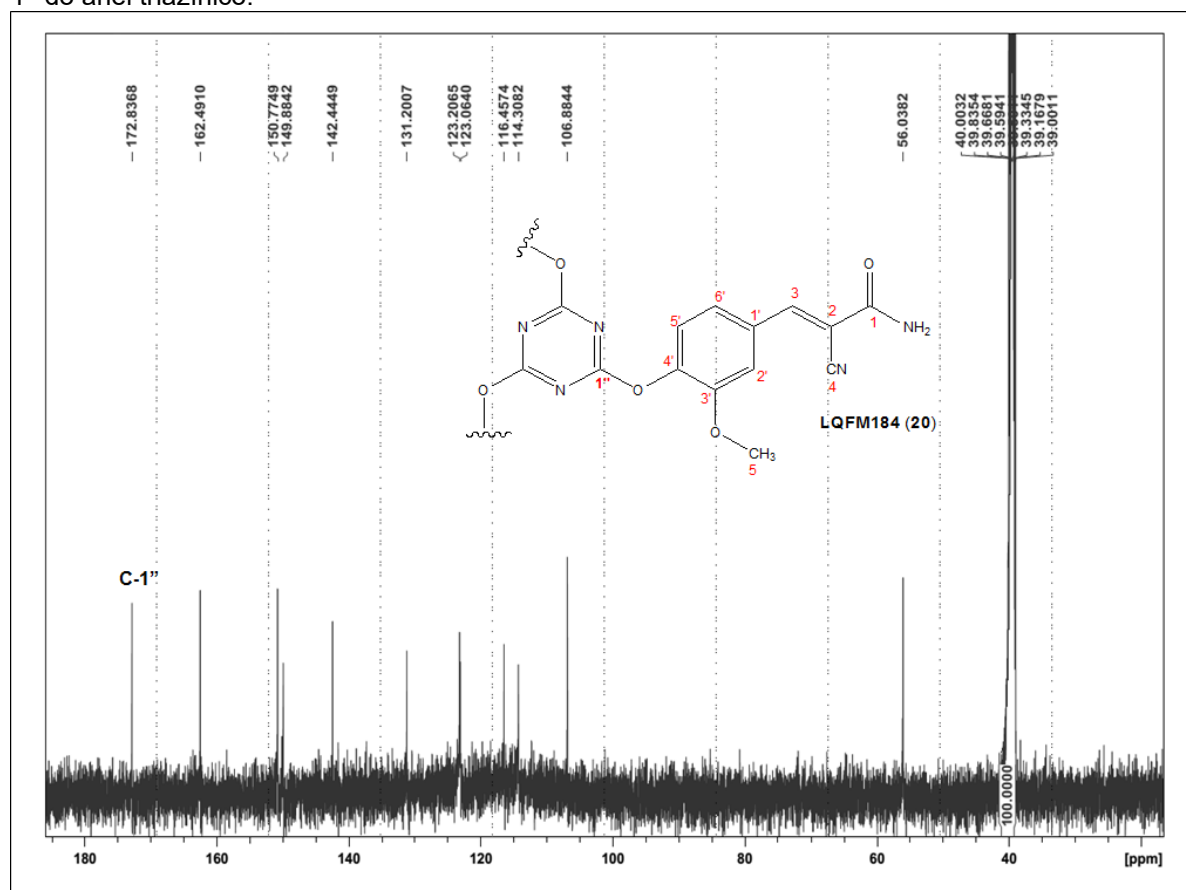
presente apenas no composto LQFM184 (**20**), ao qual sofre o efeito de anisotropia diamagnética.

Na região do espectro dos hidrogênios alifáticos da posição 5 observamos o simpleto relativo à metoxila, apresentando os mesmos valores de acoplamento para ambos os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) como ilustrado na **Figura 30**. Os átomos de hidrogênio das metoxilas se apresentam como simpleto por não estarem acoplando com outros átomos de hidrogênio.

Uma vez identificados os átomos de hidrogênios, procedeu-se então à interpretação dos experimentos de correlação bidimensionais, inicialmente caracterizando os acoplados a 1J com os átomos de hidrogênio, para os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**), através do experimento de *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) (**Tabela 10**). Da mesma forma, os átomos de carbono acoplados em longas distâncias $^{2,3}J$ aos átomos de hidrogênio foram atribuídos através de experimentos de *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC). Dentre todas as atribuições, o C-5' para o composto LQFM184 (**20**) foi o que apresentou diferença significativa no acoplamento, uma vez que os compostos **17** e **18** apresentaram acoplamentos em 116,1 e 116,5, respectivamente; enquanto para o composto LQFM184 (**20**) o mesmo apresentou acoplamento em 131,2. Este fato pode ser justificado pela maior proximidade do C-5' ao anel triazínico (**Tabela 10**).

A partir do experimento de ^{13}C bidimensional para o composto LQFM184 (**20**) foi possível se confirmar a formação do mesmo, uma vez que o átomo de H-5' apresentou correlação 4J com o átomo de C-1'' triazínico com $\delta = 172,8$, semelhante ao observado em outros compostos já publicados (MENICAGLI et al., 2004; KOC et al., 2010; DUAN et al., 2011) (**Figura 31**).

Figura 31 - Espectro de ^{13}C do composto LQFM184 (**20**) com destaque para o carbono da posição 1'' do anel triazínico.

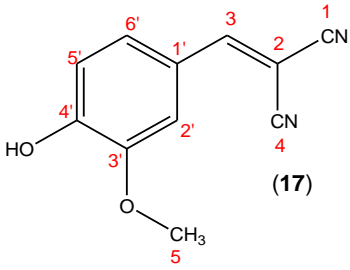
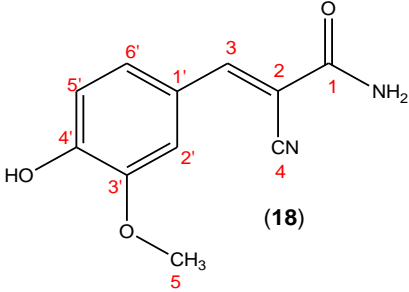
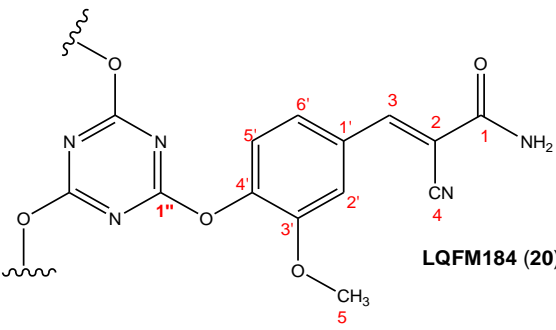


5.5.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, pois constitui um dos principais recursos complementares para a identificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos. Os espectros de infravermelhos fornecem correlações entre as absorções de estiramento e deformação em número de onda ν ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) e os respectivos e principais grupos funcionais ou ligações químicas correspondentes. Além disso, a comparação da região de impressão digital ($1400\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) com o espectro de uma amostra padrão é de fundamental importância para confirmar a identidade do composto analisado (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991; LOPES; FASCIO, 2004). Cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, desta forma, tipos idênticos de ligação em diferentes compostos podem apresentar padrões de absorção no infravermelho semelhantes, mas não exatamente iguais. Por conseguinte, as absorções de cada tipo de ligação são encontradas apenas em certas faixas do infravermelho vibracional (PAVIA et al., 2010).

As principais frequências de absorção no infravermelho para os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) estão dispostas na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Principais frequências de absorção no infravermelho para os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**).

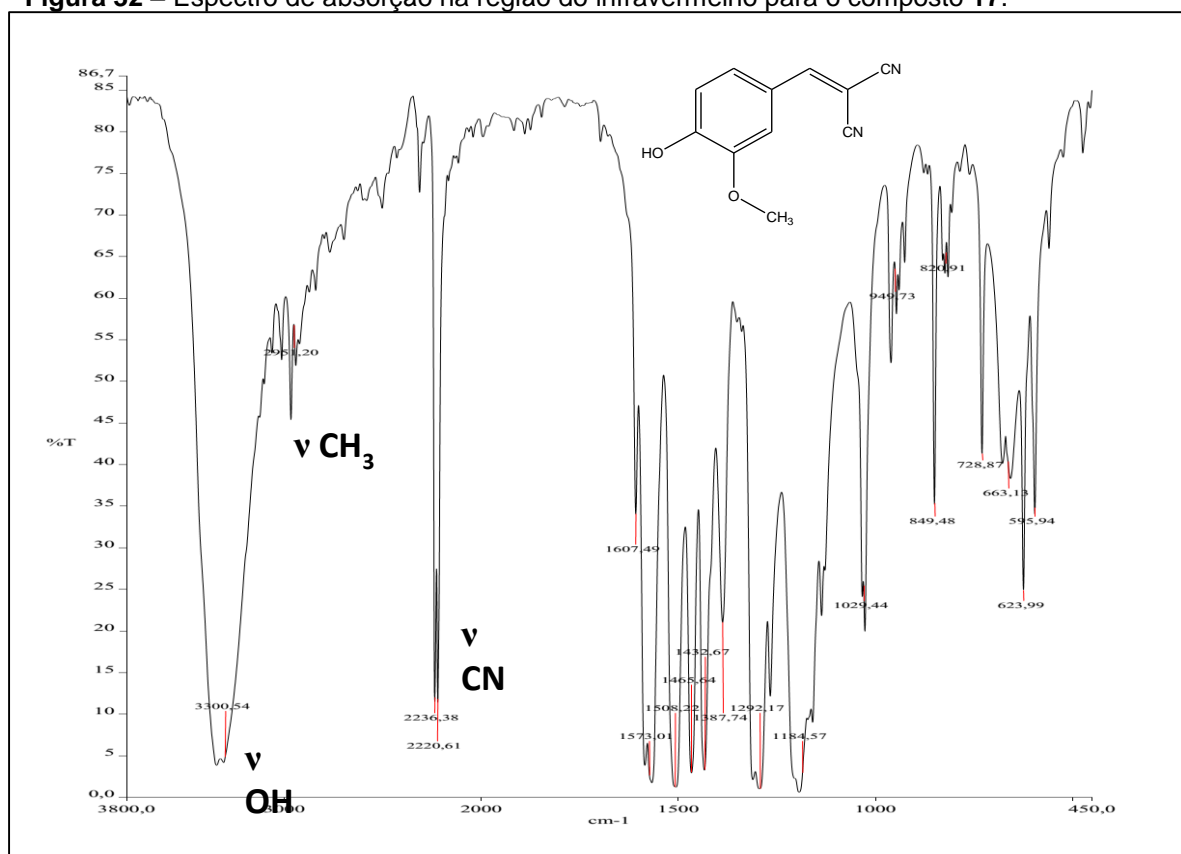
 <p>(17)</p>	n°	Frequência (cm⁻¹)
	v O-H aromático	3400 - 3300
	v C-H aromático	Sobreposto ao OH
	v C-H CH ₃	2951
	v C-N Nitrila	2236 e 2220
 <p>(18)</p>	n°	Frequência (cm⁻¹)
	v N-H Amida	3474
	v N-H Amida	3465
	v O-H aromático	3400 - 3300
	v C-H aromático	Sobreposto ao OH
	v C-N Nitrila	2211
	v C=O Amida	1683
 <p>LQFM184 (20)</p>	n°	Frequência (cm⁻¹)
	v O-H aromático	-
	v C-H aromático	-
	v N-H Amida	3290
	v N-H Amida	3275
	v C-H CH ₃	2937
	v C-N Nitrila	2218
v C=O Amida	1692	

Através da análise dos espectros de absorção no infravermelho, os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) apresentaram frequências de estiramento muito próximas em 2236/2220, 2211 e 2218 cm⁻¹, respectivamente, relativas às subunidades nitrilas (v CN). De acordo com a literatura, as amidas primárias apresentam frequências de estiramento N-H na faixa de 3475 a 3150 cm⁻¹ (PAVIA et al., 2010), sendo assim, as subunidades amidas (v NH₂) para os compostos **18** e LQFM184 (**20**) apresentaram frequências de estiramento em 3474/3465 e 3290/3275 cm⁻¹, respectivamente. Em ambos, as subunidades v NH₂ apresentaram duas bandas na região N-H resultantes

de vibrações de estiramento assimétrica e simétrica, caracterizando-as como amidas primárias. Devido ao efeito de conjugação, a subunidade amida do composto LQFM184 (**20**) absorve a radiação em frequências mais baixas quando comparado à frequência de absorção da mesma subunidade do composto **18**. Para estes dois compostos pode-se observar também bandas de absorção de alta intensidade em 1683 e 1692 cm^{-1} relativas à subunidade carbonila ($\nu \text{C=O}$), respectivamente (**Figuras 18 e 19; Tabela 11**).

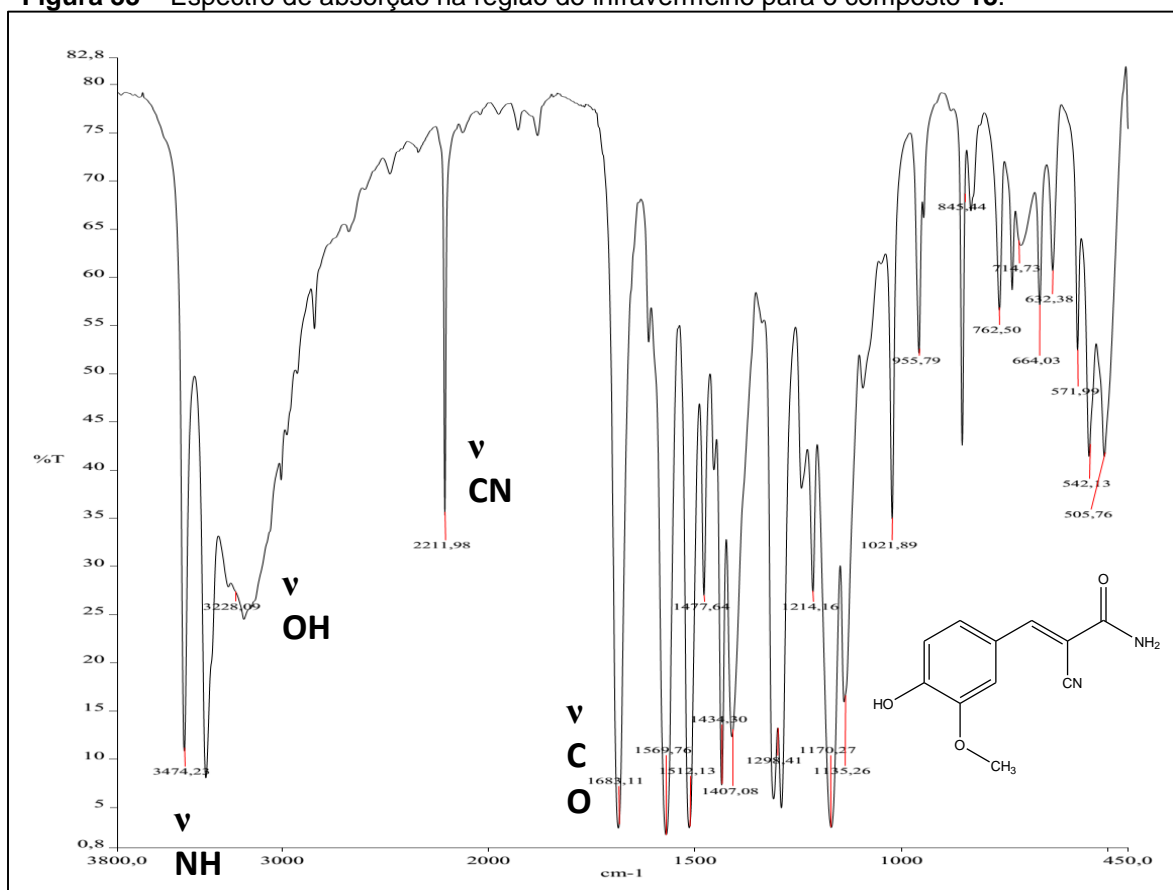
No entanto, os compostos **17** e **18** apresentam frequências de estiramento na faixa de 3400 - 3300 cm^{-1} , relativas à subunidade hidroxila (νOH) (**Figuras 32 e 33**).

Figura 32 – Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto **17**.



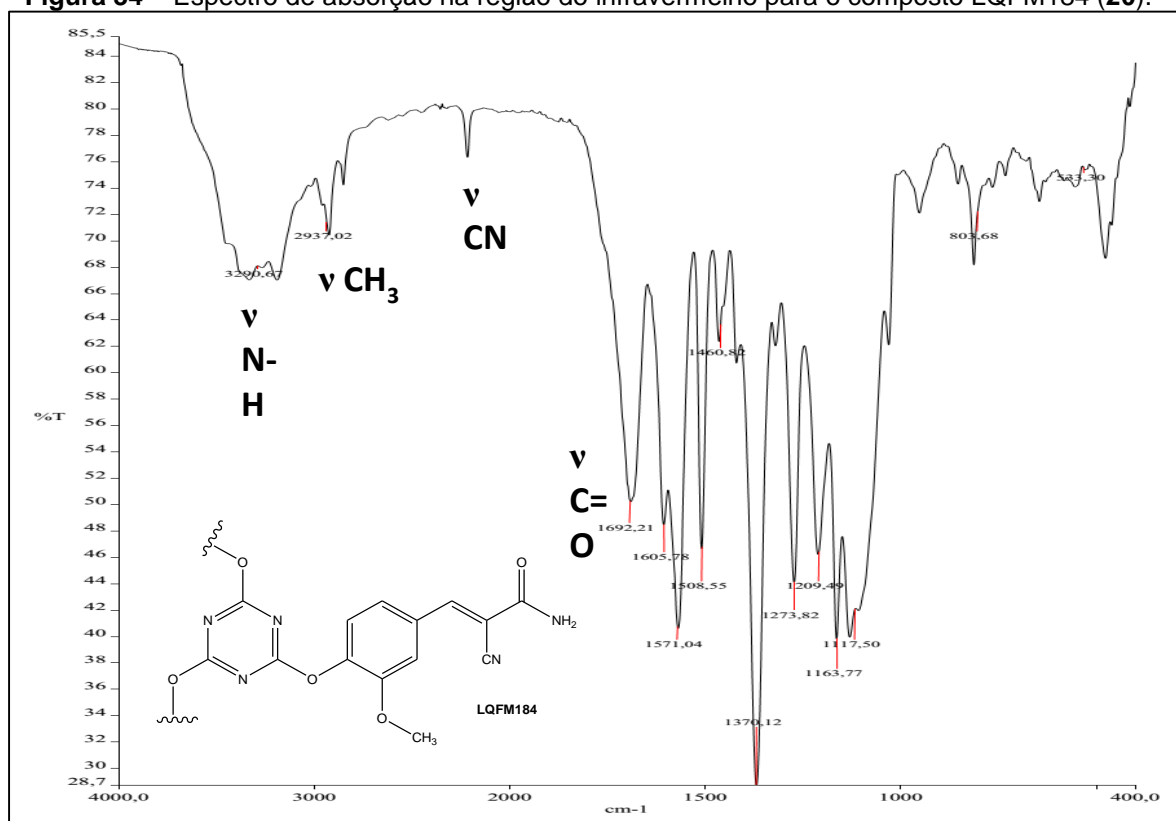
Na **Figura 32** o pico relativo à subunidade νOH para o composto **17** se apresenta como um pico largo e longo, caracterizando formação de ponte de hidrogênio intermolecular, assim como o apresentado no espectro de absorção do composto **18** (**Figura 33**).

Figura 33 – Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto **18**.



Todavia, tal subunidade ν OH não está presente no espectro de absorção do LQFM184 (**20**), uma vez que são observadas nesta faixa apenas as duas bandas de absorção da subunidade amida, caracterizando a estrutura proposta (**Figura 34**). Apesar do espectro de absorção no infravermelho apresentar outras frequências, as mencionadas acima são as mais relevantes.

Figura 34 – Espectro de absorção na região do infravermelho para o composto LQFM184 (**20**).



5.5.3 Espectrometria de Massas

A partir das análises por espectrometria de massas através da técnica de ionização por “*electrospray*” (ESI-EM) com analisador do tipo FT-ICR, para os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) foi possível evidenciar, sem ambiguidade, se tratar das estruturas idealizadas. Uma vez que seus picos de íons moleculares encontram-se presentes nos espectros das **Figuras 35**, **36** e **37**, assim como os valores do modo negativo ($[M - H]^-$) para os compostos **17** e **18** e positivo ($[M + H]^+$) para o composto LQFM184 (**20**), respectivamente.

No espectro de massas do composto **15**, presente na **Figura 35**, observamos que o pico do íon molecular $[M - H]^-$, $m/z = 199,05122$, cujo m/z teórico é 200,05130, coincide com o pico base do espectro. A partir da ionização do composto, observamos o íon molecular $[M - H]^-$, $m/z = 199$ referente a perda do átomo de hidrogênio fenólico, cuja exatidão de massa é igual a 0,42 ppm. As mesmas características podem ser observadas no espectro do composto **18**, cujo pico do íon molecular corresponde a $[M - H]^-$, $m/z = 217,06177$ com m/z teórico igual a 218,06914 e exatidão de massa de 0,45 ppm (**Figura 36**).

Figura 35 – Espectro de massas do composto **17**.

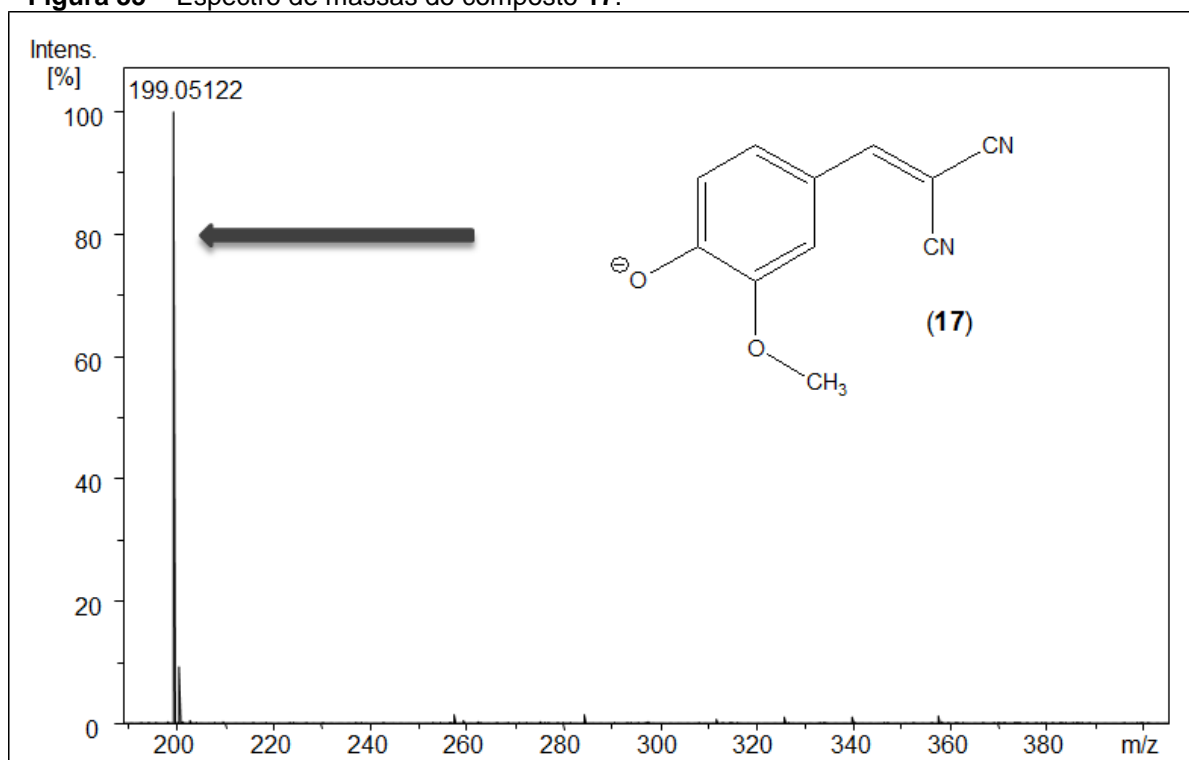
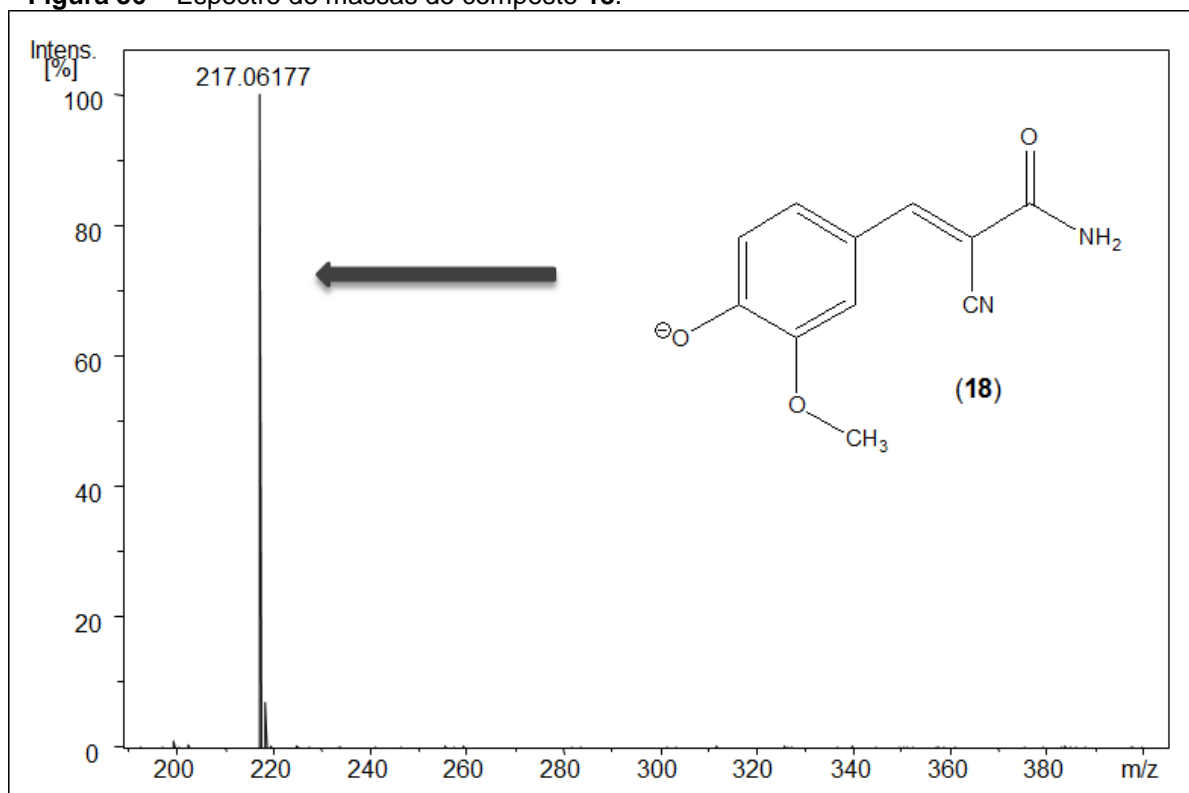


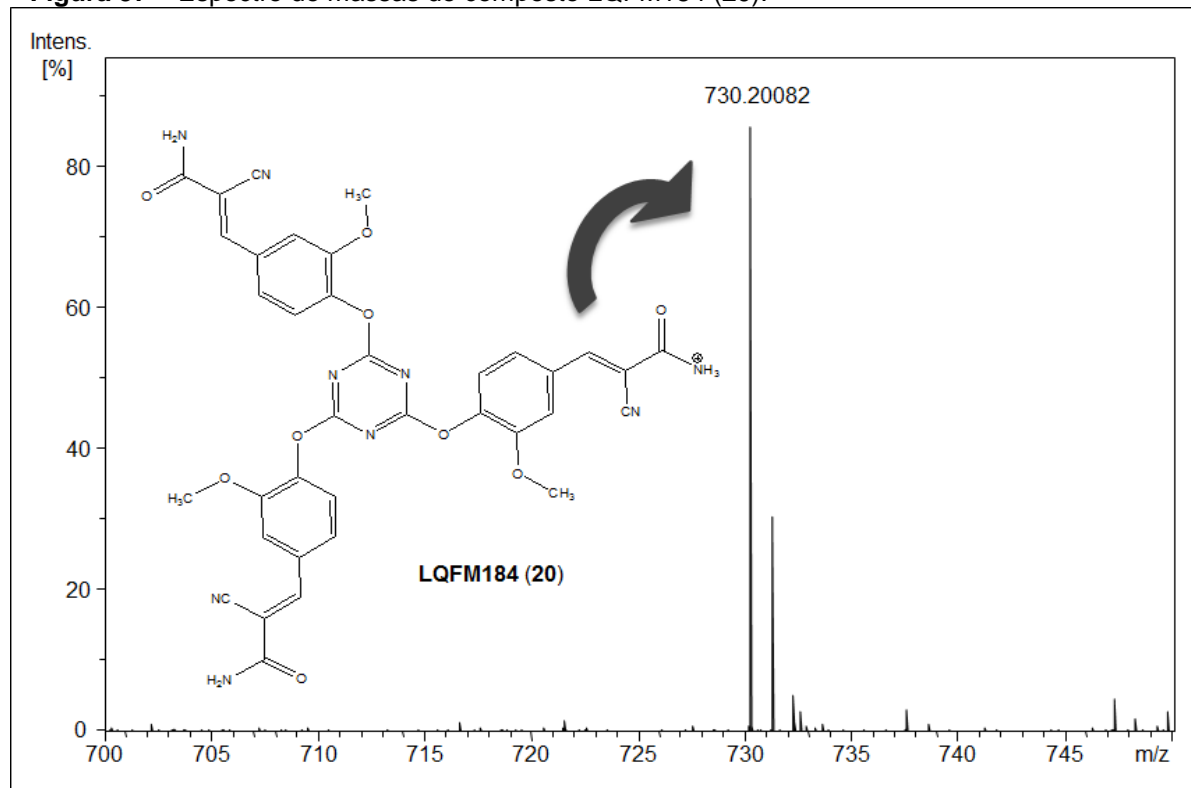
Figura 36 – Espectro de massas do composto **18**.



No espectro de massas do composto LQFM184 (**20**) observamos que o pico do íon molecular $[(M + H)^+]$, $m/z = 730,20082$ também coincide com o pico base, sendo a m/z teórico igual a 729,19317 (**Figura 37**). Devido ao seu peso molecular e maior

estrutura quando comparado aos compostos **17** e **18**, o espectro de massas para o LQFM184 (**20**), cuja exatidão de massa corresponde a 0,50 ppm, é habilitado como metodologia complementar à formação estrutural deste candidato a protótipo de fotoprotetor.

Figura 37 – Espectro de massas do composto LQFM184 (**20**).



5.5.4 Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta

Vários dados podem ser gerados a partir de espectros UV para auxiliar na identificação e caracterização de compostos químicos presentes em fotoprotetores (SHAATH, 2007; REZENDE et al., 2014).

Para avaliarmos o comportamento do composto LQFM184 (**20**) frente às possibilidades de transições eletrônicas, realizamos leituras espectrais na região do ultravioleta de 250 a 450 nm e, assim, procedemos ao cálculo do coeficiente de absorvidade molar (ϵ).

Inicialmente foram analisados os espectros de ultravioleta dos compostos 2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)malononitrila (**17**) e (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (**18**) para efeito comparativo ao composto LQFM184 (**20**). De acordo com resultados obtidos, o composto **17** apresentou picos máximos de absorção na faixa da UVA em 320 e 366 nm após a realização de varreduras de

soluções sob variadas concentrações utilizando clorofórmio grau P.A. como solvente (**Figura 38**). Na sequência, o composto **18** apresentou picos de absorção no UV em 256, 310 e 356 nm. Este que apresentou absorbâncias relevantes apenas na faixa da UVB e UVA, sendo que os picos em UVA apresentaram perfil espectral semelhante ao composto **17** (**Figura 39**).

Figura 38 – Espectro de absorção no ultravioleta para o composto **17** com varreduras em variadas concentrações utilizando clorofórmio como solvente.

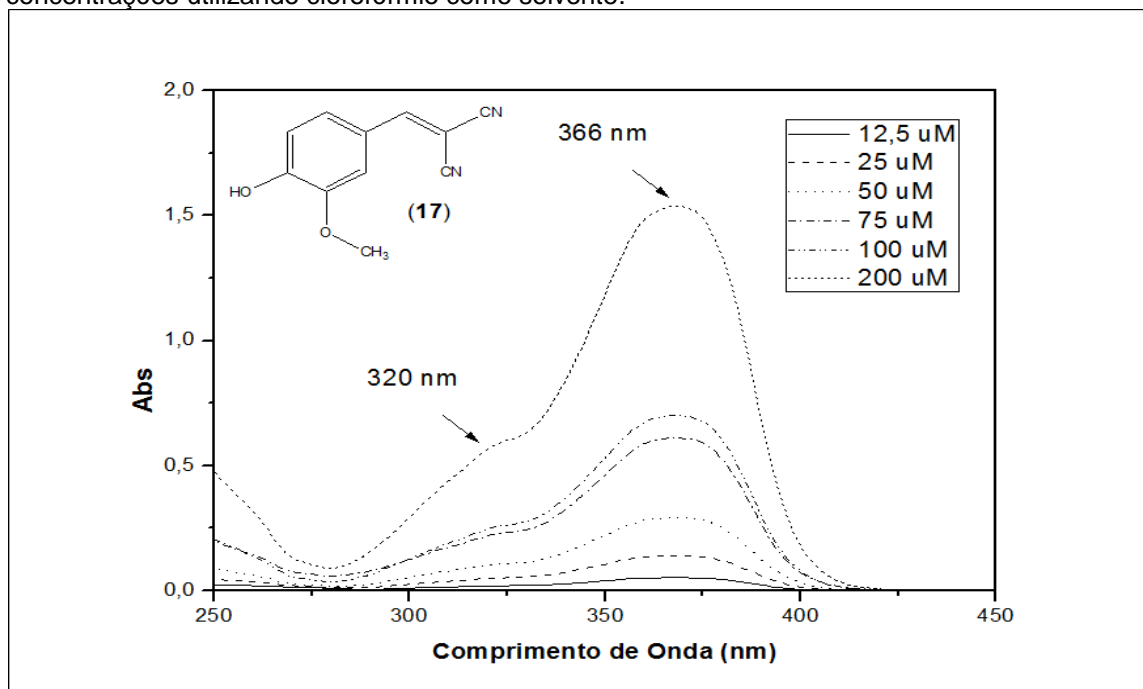
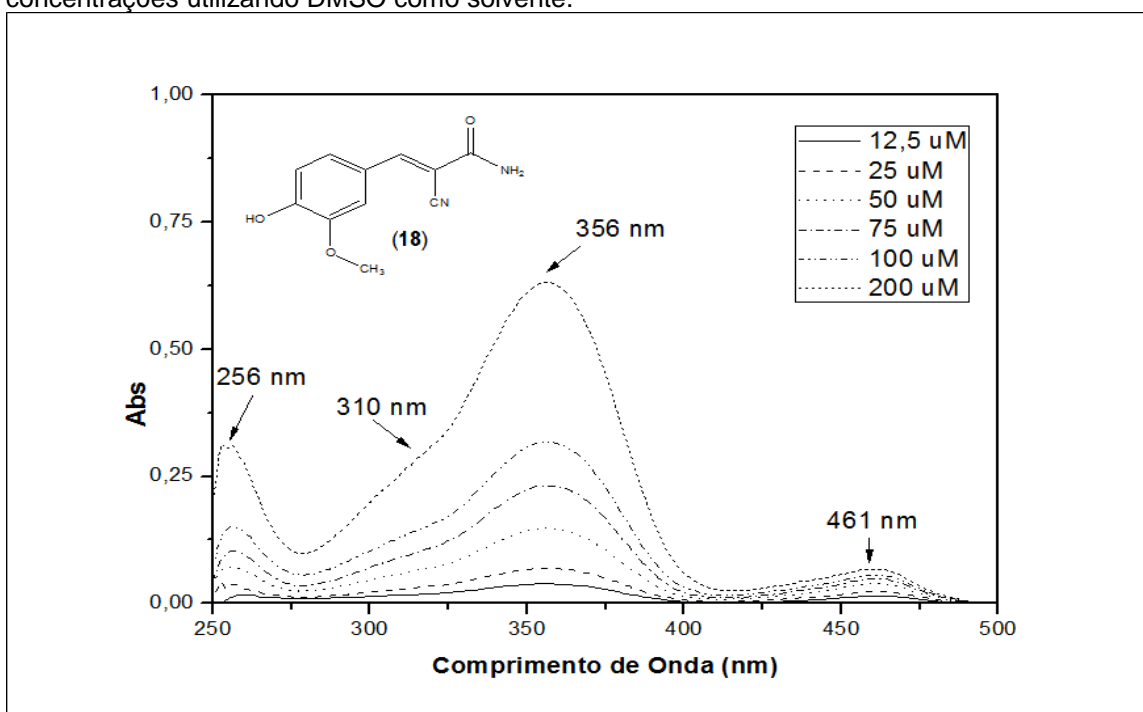
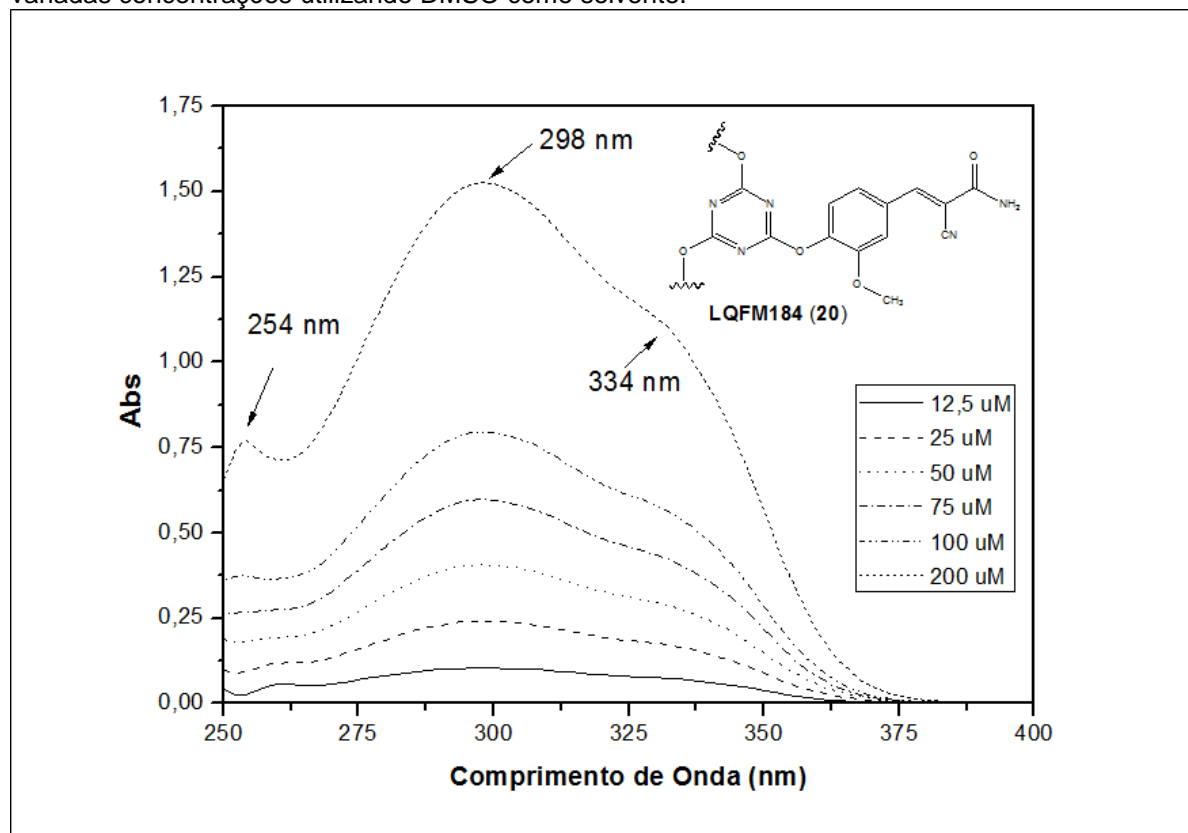


Figura 39 – Espectro de absorção no ultravioleta para o composto **18** com varreduras em variadas concentrações utilizando DMSO como solvente.



Por fim, foram realizadas as varreduras do espectro de ultravioleta para o composto LQFM184 (**20**), no qual o mesmo apresentou dois picos de absorção máxima, relevantes, em 298 e 334 nm do UV, como ilustrado na **Figura 40**.

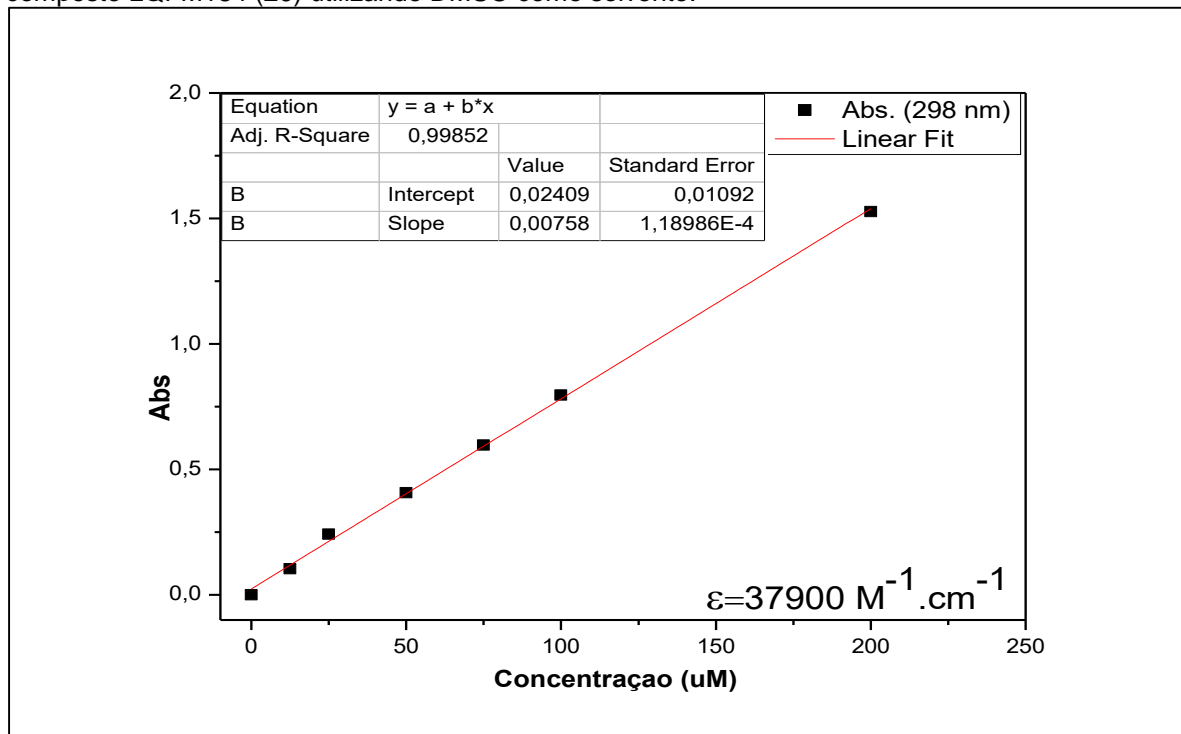
Figura 40 – Espectro de absorção no ultravioleta para o composto LQFM184 (**20**) com varreduras em variadas concentrações utilizando DMSO como solvente.



A partir dos resultados obtidos para o composto LQFM184 (**20**) podemos considerar que o mesmo é uma otimização das propriedades fotoprotetoras, quando comparado aos seus precursores, compostos **17** e **18**, uma vez que absorve a radiação UV nas faixa da UVB ($\lambda_{máx.} = 298$ nm) e da UVA ($\lambda_{máx.} = 334$ nm) configurando-o como um absorvedor de amplo espectro. O pico apresentado em 254 nm não é relevante para este trabalho, pois o mesmo está presente na faixa da UVC e esta radiação não atinge a superfície terrestre. Este composto apresenta subunidades cromóforas em sua estrutura que lhe confere perfil semelhante àqueles presentes em filtros solares disponíveis no mercado, *i.e.*, Tinosorb® S (**11**), cujos máximos de absorção ocorrem em 310 e 343 nm (SHAATH, 2007); tal como o composto LQFM048 (**14**) desenvolvido por Vinhal e colaboradores (2016), que apresenta picos máximos de absorbância em 306 nm (UVB) e 344 nm (UVA I).

Dando prosseguimento à investigação dos descritores de fotoproteção, foi calculado o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) como ilustrado na **Figura 41**. Foram utilizados os dados de absorbância gerados a partir das várias concentrações de soluções preparadas do composto LQFM184 (**20**), e estes foram exportados para o *software* Origin 8.0 obtendo-se o gráfico contido na **Figura 41**.

Figura 41 – Curva de calibração utilizada no cálculo do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para o composto LQFM184 (**20**) utilizando DMSO como solvente.



Frente aos dados estabelecidos para fotoprotetores já comercializados como o Tinosorb® M e Tinosorb® S, cujos valores de ϵ correspondem a $26.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $46.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente, (SHAATH, 2010), o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) igual a $37.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ apresentado pelo LQFM184 (**20**) no $\lambda_{\text{máx}}$ sugere que este composto absorve intensamente a radiação UV. Visto que valores acima de 10^4 são denominados absorções de alta intensidade, enquanto valores abaixo de 10^3 são absorções de baixa intensidade no espectro eletromagnético (PAVIA et al., 2010).

A absorvidade molar é uma propriedade do composto que passou por transições eletrônicas, não estando relacionada aos parâmetros variáveis envolvidos na preparação da solução. As dimensões do sistema absorvente e probabilidade de a transição eletrônica ocorrer são os fatores que controlam a absorvidade, que vai de 0 a 10^6 . Para uma mesma espessura do absorvedor (caminho óptico), quanto

maior o valor de ϵ maior será a taxa de absorção observada e mais sensível o método espectrofotométrico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991; SHAATH, 2007). Assim sendo, a absorvidade molar, depende da substância, do comprimento de onda utilizado, da temperatura e do solvente. Esta e outras características apresentadas acima colocam a triazina LQFM184 (**20**) como promissor candidato a fotoprotetor, bastante semelhante aos pertencentes às classes das HPTs e HBzTs.

De acordo com Shaath (2007), a análise espectroscópica é o método de escolha para identificação de filtros UV e elucidação de suas estruturas moleculares, além de ser um método crucial em sua caracterização. A absorção molecular de radiação ultravioleta ou visível geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação e depende da estrutura eletrônica do composto. Como resultado, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; REZENDE et al., 2014).

Assim, as aplicações da espectroscopia de absorção no UV-Vis são importantes para a determinação quantitativa e qualitativa de compostos contendo grupos cromóforos, tais como aquelas presentes nos protetores solares.

5.5.5 Espectroscopia de Fluorescência

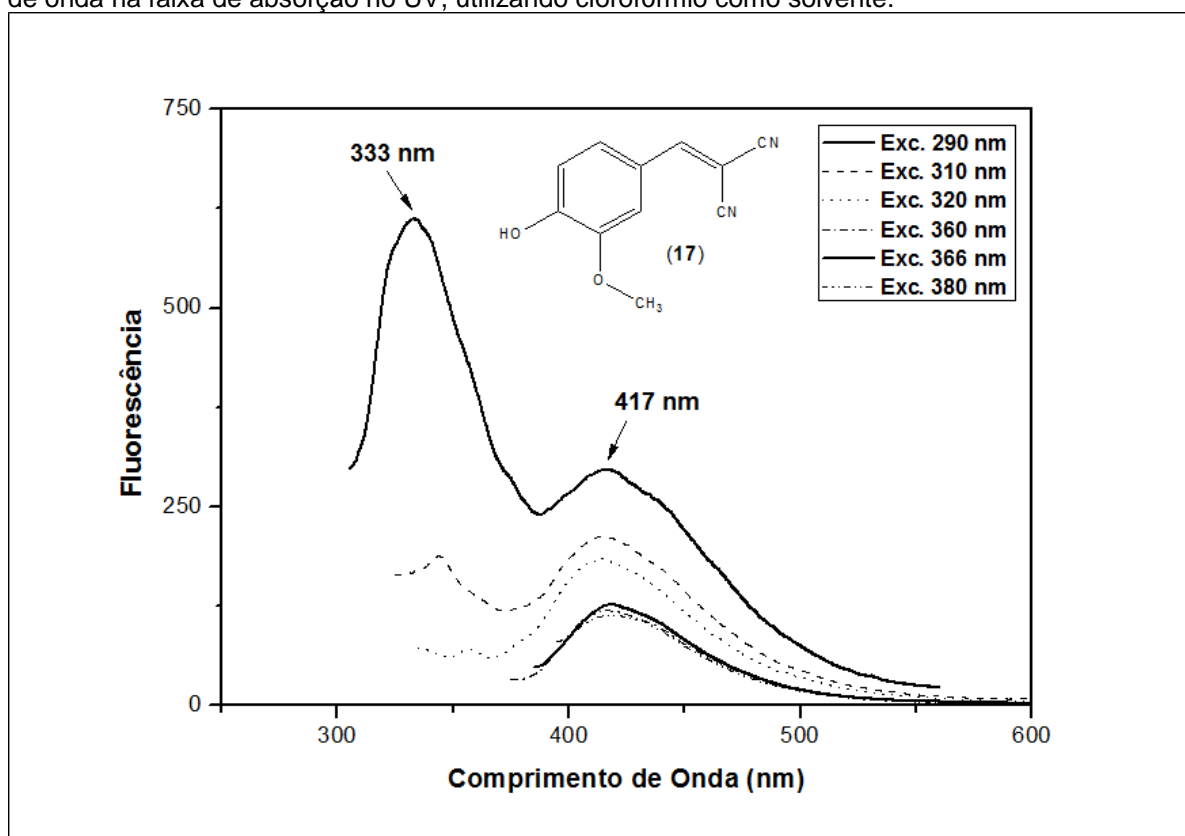
Embora a absorção no UV seja a propriedade primária utilizada para decidir se um composto pode agir como protetor solar eficaz, a investigação de processos pós-absorção são igualmente importantes. Desta forma, os compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) foram submetidos à análise de espectroscopia de fluorescência com o intuito de verificar em qual região do espectro estes emitem a radiação incidente. De modo geral, os compostos, em seu nível mais baixo de energia, foram excitados por absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda dos quais os mesmos apresentaram absorção no UV. Posteriormente, mediu-se a intensidade relativa da radiação eletromagnética emitida quando as espécies retornaram ao estado fundamental liberando o excesso de energia absorvida na forma de fótons (fluorescência).

A fluorescência é um processo rápido e se completa em cerca de 10^{-8} s depois do momento da excitação. As bandas de fluorescência molecular reproduzidas no espectro são constituídas por linhas de comprimentos de onda maiores e de menor energia que a banda da radiação absorvida, responsável pela sua excitação, que

representam as transições do estado vibracional mais baixo – estado excitado (E_1) para os muitos níveis vibracionais diferentes de E_0 (estado fundamental) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; ENCHEV et al., 2015).

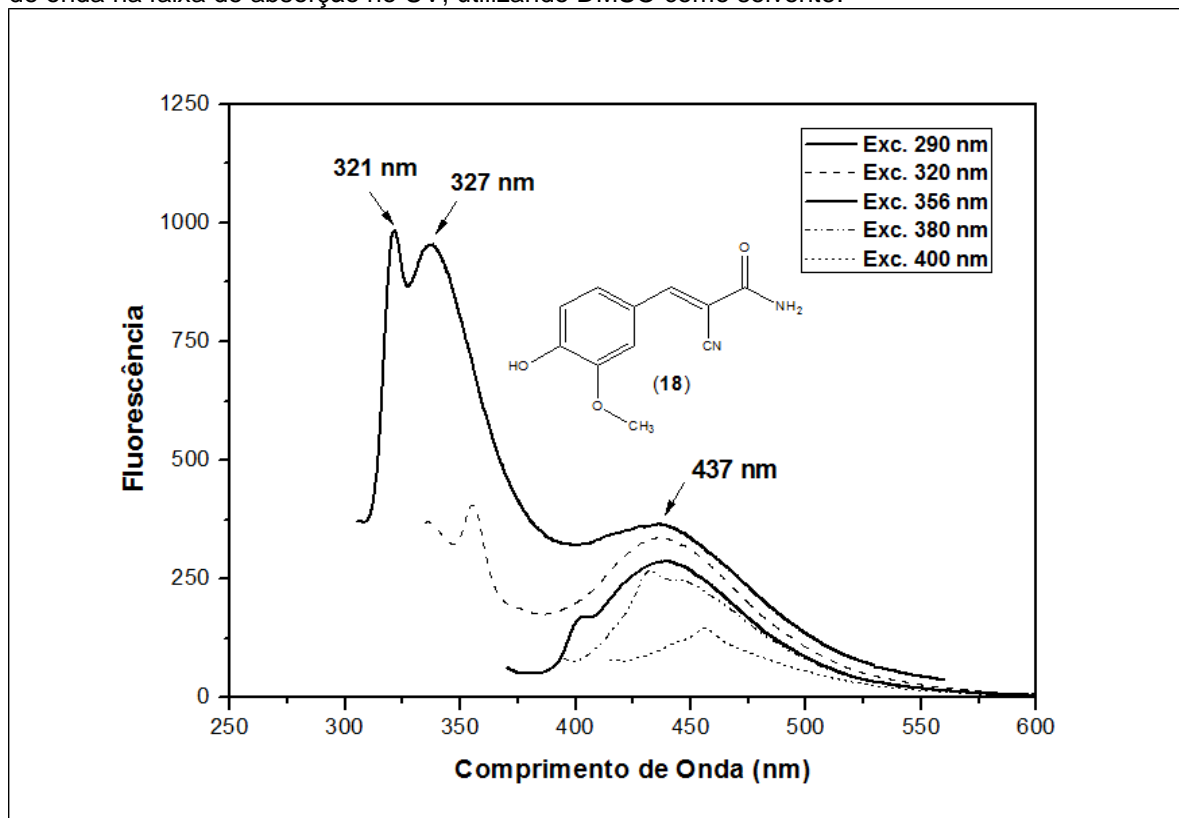
O composto **17** apresentou pico de absorção no UV em 320 nm de baixa intensidade e outro pico em 366 nm de maior intensidade. Estes comprimentos de onda foram utilizados para a excitação da amostra do composto no qual apresentou picos de emissão em 333 nm e 417 nm com baixa intensidade de fluorescência (**Figura 42**).

Figura 42 – Espectro de fluorescência para o composto **17** submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando clorofórmio como solvente.



O composto **18** apresentou picos de emissão em 321, 327 e 437 nm, enquanto que os picos máximos de absorção no UV foram em 256, 310 e 356 nm. O padrão do espectro de emissão e de intensidade de fluorescência foi semelhante ao apresentado pelo composto **17**, ao passo que ambos apresentam estruturas moleculares semelhantes (**Figura 43**).

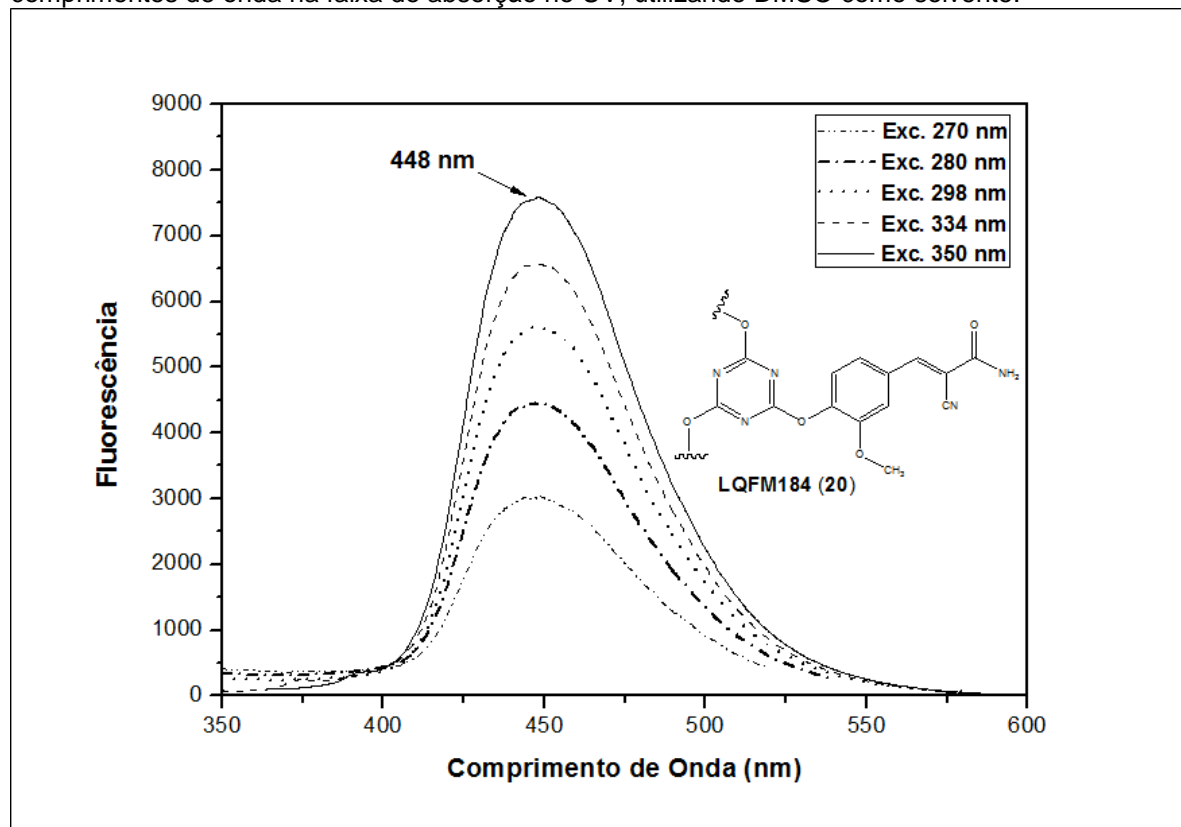
Figura 43 – Espectro de fluorescência para o composto **18** submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando DMSO como solvente.



Como ilustrado no espectro de fluorescência da **Figura 44**, observamos que o composto LQFM184 (**20**) apresentou pico máximo de emissão em 448 nm. A intensidade de fluorescência para o $\lambda_{\text{máx.}}$ de 298 nm foi menor em relação ao $\lambda_{\text{máx.}}$ de 334 nm. Este resultado demonstra que o composto **20** proposto absorve na região da UVB e UVA e emite a radiação excedente em comprimentos de onda maiores e menos energéticos, ou seja, atribui deslocamento batocrômico - deslocamento para o vermelho (KHOEE; ZAMANI, 2007; KRISHNAN; NORDLUND, 2008; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014) ao sistema conjugado LQFM184 (**20**) uma vez que a radiação incidente é não destrutiva à estrutura molecular, caracterizando-o como promissor candidato a filtro solar eficiente.

Outro parâmetro espectroscópico a ser avaliado é o rendimento quântico de fluorescência molecular que consiste na razão entre o número de moléculas que fluorescem e o número total de moléculas excitadas, ou a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; KRISHNAN; NORDLUND, 2008; ENCHEV et al., 2015). Desta forma, o composto LQFM184 (**20**) apresentou eficiência quântica qualitativa maior quando comparado aos compostos **17** e **18** por apresentar maior intensidade de fluorescência (**Figura 44**).

Figura 44 – Espectro de fluorescência para o composto LQFM184 (**20**) submetido à excitação em comprimentos de onda na faixa de absorção no UV, utilizando DMSO como solvente.



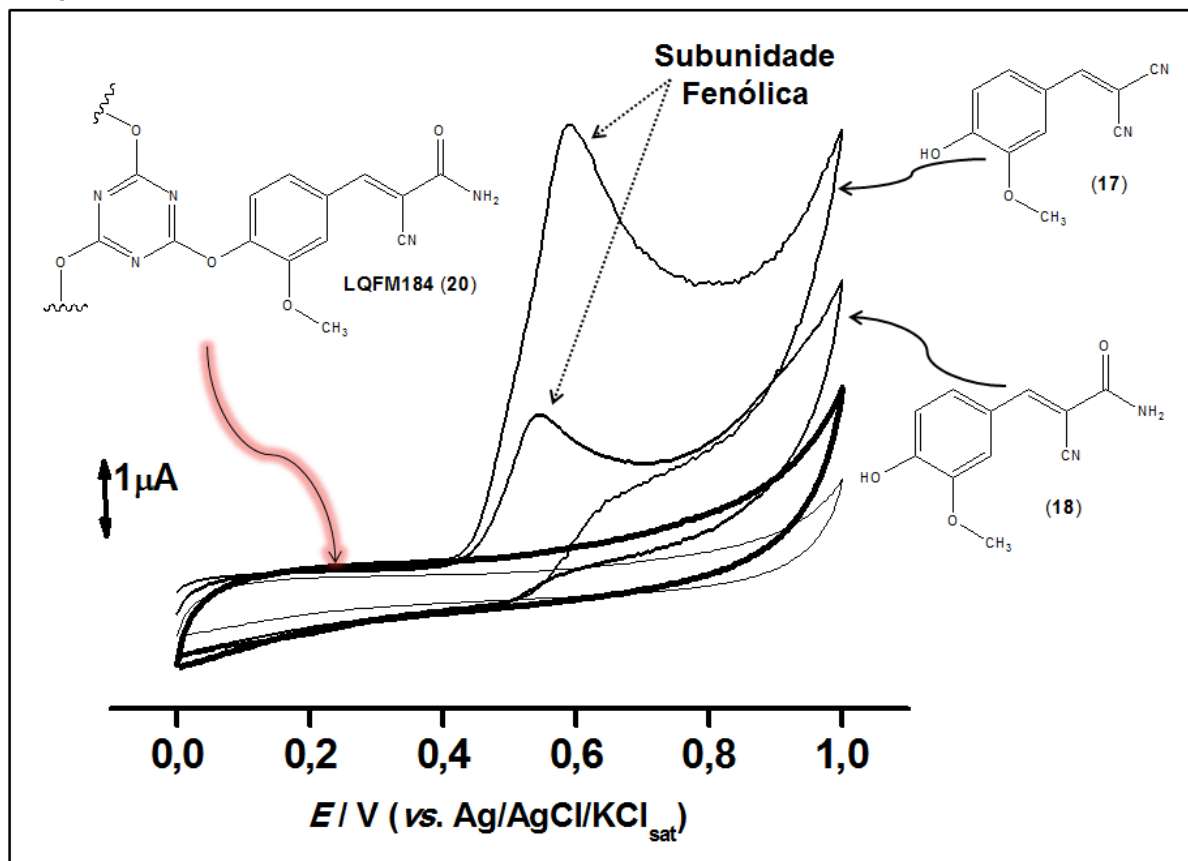
Tal fato pode ser justificado pela sua composição estrutural, uma vez que o composto LQFM184 (**20**) contém vários anéis aromáticos, além de apresentar uma estrutura rígida que facilita a ocorrência da relaxação por fluorescência.

5.6 Avaliação do Potencial Redox por Voltametria Cíclica

A fim de identificarmos a estabilidade dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) frente aos potenciais de oxidação e redução, ambos os compostos foram avaliados através da técnica de voltametria cíclica.

O perfil redox dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) estão ilustrados na **Figura 45**, ao qual foram empregados eletrodos de pasta de carbono modificados. Análises voltamétricas das amostras dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**) em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0 como eletrólito suporte, resultaram em voltamogramas reprodutíveis que podem, a princípio, serem utilizados como meio de caracterização complementar destes compostos.

Figura 45 - Voltamograma cíclico comparativo entre amostras dos compostos **17**, **18** e LQFM184 (**20**). Tampão Fosfato 0,1 M, pH 5,0. Faixa de varredura -0,25 a 1,25 V. Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.



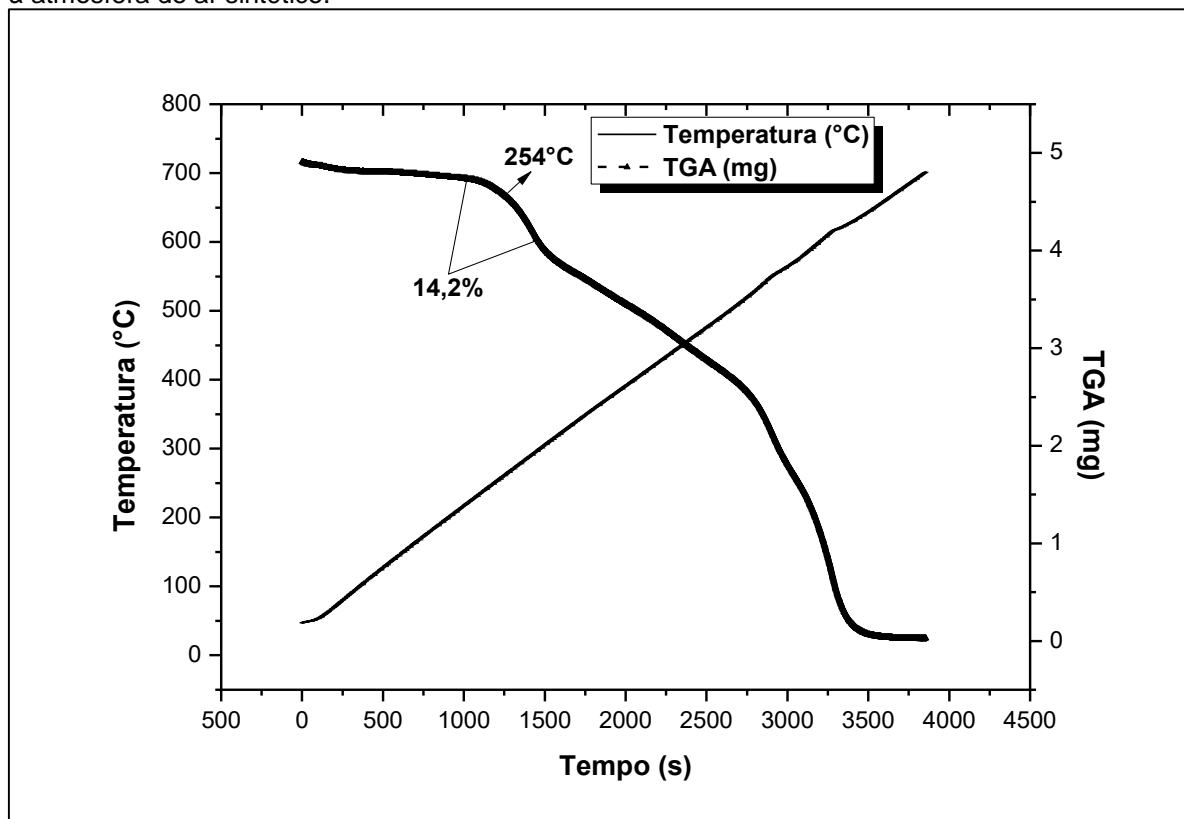
São identificados maiores níveis de corrente nos compostos **17** e **18**, devido à presença da subunidade fenólica, quando comparado com composto LQFM184 (**20**) do qual apresentou picos anódicos quase que imperceptíveis. Diferentemente dos compostos **17** e **18** que apresentaram picos anódicos em torno de 0,60 V e 0,55 V, respectivamente; fato este que aponta para a presença de maior variedade e quantidade de espécies eletroativas quando comparado ao composto LQFM184 (**20**) (**Figura 45**). Em face de tais dados, podemos concluir que os compostos **17** e **18** apresentam perfis antioxidantes, pois apresentam potenciais oxidativos e redutivos. Por outro lado, o candidato a protótipo fotoprotetor LQFM184 (**20**) não apresenta perfil antioxidante, mas apresenta maior estabilidade frente a reações redox quando comparado aos compostos **17** e **18**, uma vez que foi praticamente inerte aos potenciais aplicados.

5.7 Avaliação da Degradação por Análise Térmica Termogravimétrica

A fim de avaliarmos a estabilidade do candidato a protótipo fotoprotetor LQFM184 (**20**) frente à temperatura, procedemos à análise termogravimétrica em

atmosfera de ar sintético utilizando 5,0 mg do composto. Este apresentou perdas de massa em diferentes níveis de temperatura, como pode ser observado na **Figura 46**.

Figura 46 – Curva de TG em função do tempo e temperatura do composto LQFM184 (**20**) submetido à atmosfera de ar sintético.



A amostra iniciou sua decomposição por volta de 226°C e apresentou perda de massa ~14% com pico em 254°C e término em 297°C, ao passo que a partir desta temperatura o composto LQFM184 (**20**) pode apresentar alterações químicas e físicas relevantes. E por volta de 638,2°C a amostra concluiu a perda de massa perfazendo um total de 100% de degradação.

Pelo exposto, podemos observar que a técnica de análise térmica fornece informações relevantes frente à estabilidade térmica, além de apresentar as vantagens de utilizar pequenas quantidades de amostra (1,0 a 5,0 mg), de não exigir preparo sofisticado e disponibilizar vários resultados em um único gráfico. A amostra é colocada em ambiente no qual é possível se observar, direta ou indiretamente, modificações de massa em função da temperatura e do tempo (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

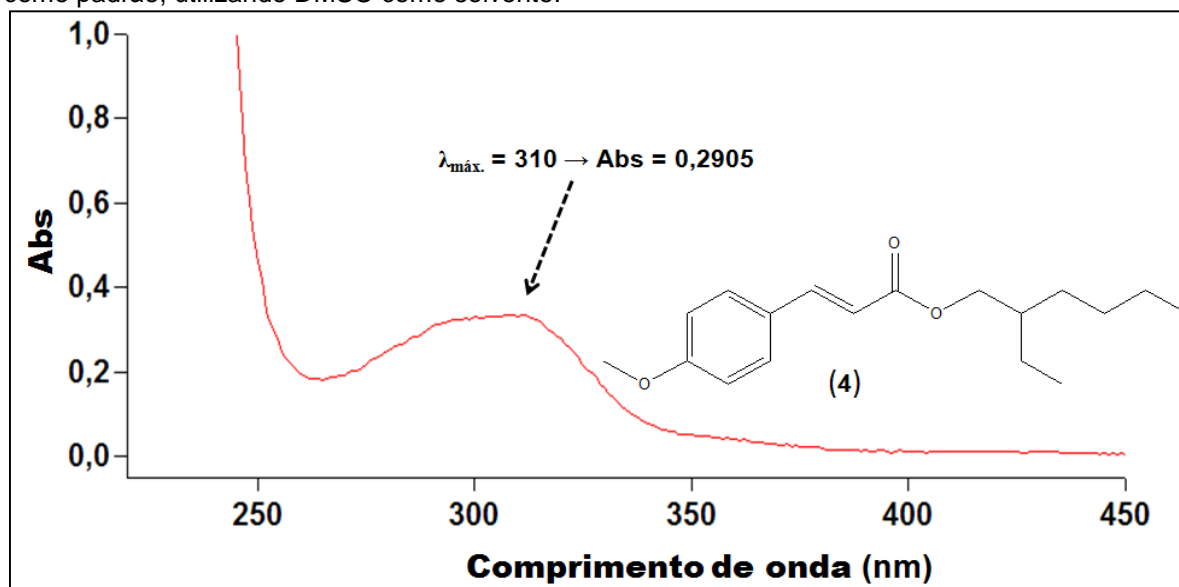
A técnica de TG termoanalítica utilizada no trabalho pôde demonstrar que alterações de massa do composto LQFM184 (**20**) não estão relacionadas com

interações com o oxigênio, mas com elevações da temperatura, visto que apresentou decomposição térmica evidente no pico de 254°C. Este resultado demonstra que o composto LQFM184 (**20**) apresenta-se termicamente estável frente a atmosfera de oxigênio, uma vez que possui ponto de fusão em 147°C.

5.8 Determinação do FPUVB a partir do método espectrofotométrico *in vitro* proposto por Mansur e colaboradores

A absorção máxima da solução padrão contendo *para*-metoxicinamato de octila (**4**) a concentração de $1,2 \times 10^{-5}$ M ocorre no comprimento de onda de 310 nm com absorvância de 0,290 (Figura 47). Segundo a literatura, o *para*-metoxicinamato de octila (**4**) apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 311 nm (SHAATH, 2007). O que está de acordo com o realizado neste trabalho.

Figura 47 – Espectro de absorção no ultravioleta para o *para*-metoxicinamato de octila (**4**), utilizado como padrão, utilizando DMSO como solvente.



Para o cálculo do FPS o *para*-metoxicinamato de octila (**4**) apresentou fator de proteção contra o UVB igual a 2,79 (Tabela 12). Considerando que o mínimo esperado para a solução era FPS = 2,0 e que protocolos de COLIPA definem que 2,7% de *para*-metoxicinamato de octila (**4**) em formulações utilizadas em testes *in vivo* produzem FPS de $3,7 \pm 0,3$ (COLIPA, 2009), a amostra padrão analisada está conforme descrito na literatura.

Tabela 12 - Comprimento de onda *versus* absorvância média para as amostras com solução padrão de *para*-metoxicinamato de octila (**4**) em concentração teórica de $1,2 \times 10^{-5}$ M, utilizando DMSO como solvente.

Tabela 13 - Comprimento de onda *versus* absorvância média para as amostras com solução do composto LQFM184 (20) em concentração teórica de $1,3 \times 10^{-5}$ M, utilizando DMSO como solvente.

λ (nm)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DP	FC	$E \lambda \times I \lambda$	$(E \lambda \times I \lambda) \times Média$
290	0,36	0,362	0,361	0,361	0,001	10	0,015	0,005415
295	0,384	0,384	0,38	0,382667	0,002309	10	0,0817	0,031263867
300	0,383	0,382	0,383	0,382667	0,000577	10	0,2874	0,1099784
305	0,371	0,37	0,374	0,371667	0,002082	10	0,3278	0,121832333
310	0,356	0,355	0,358	0,356333	0,001528	10	0,1864	0,066420533
315	0,37	0,336	0,337	0,347667	0,019348	10	0,0839	0,029169233
320	0,311	0,31	0,313	0,311333	0,001528	10	0,018	0,005604
Total							1,0002	
FPS								3,696833667

Todavia, pode-se concluir que o FPS estimado por espectrofotometria é um número que avalia o filtro de acordo com a intensidade, largura e localização da sua curva de absorção dentro do espectro do ultravioleta. Contudo, este método proposto por Mansur et al. (1986) ignora a capacidade de aderência, penetração e distribuição do produto fotoprotetor na pele. Apesar disso, existem estudos (DIFFEY; ROBSON, 1989) que demonstram boa correlação deste teste com metodologias *in vivo*, quando o filtro solar apresenta-se incorporado em formulação.

5.9 Determinação do perfil toxicológico *in vitro*

5.9.1 Avaliação do potencial de irritação ocular através do ensaio de STE

O ensaio de STE é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias e com limitações específicas para a classificação de risco e rotulagem de compostos químicos que induzem lesões oculares graves bem como aqueles que não requerem classificação tanto para lesões oculares graves ou irritação ocular, tal como definido pela UN GHS (UN, 2013).

Desta forma, o STE apresentou-se como metodologia viável para a avaliação do potencial de irritação ocular do composto LQFM184 (20). A **Tabela 14** demonstra os resultados de irritação ocular obtidos no ensaio STE, baseados na concentração e viabilidade relativa resultante de uma exposição a 5,0% ou 0,05% do composto-teste.

Tabela 14 – Resultados do ensaio de STE para o composto LQFM184 (20).

Exposição	Viabilidade Celular (%)		Classificação UN GHS
	5,0%	0,05%	

Controle Negativo (PBS)	100	100	Sem Categoria
Controle Positivo (Cloreto de Benzalcônio)	2,7	5,6	Categoria 1
LQFM184 (20)	72,1	86,5	Sem Categoria

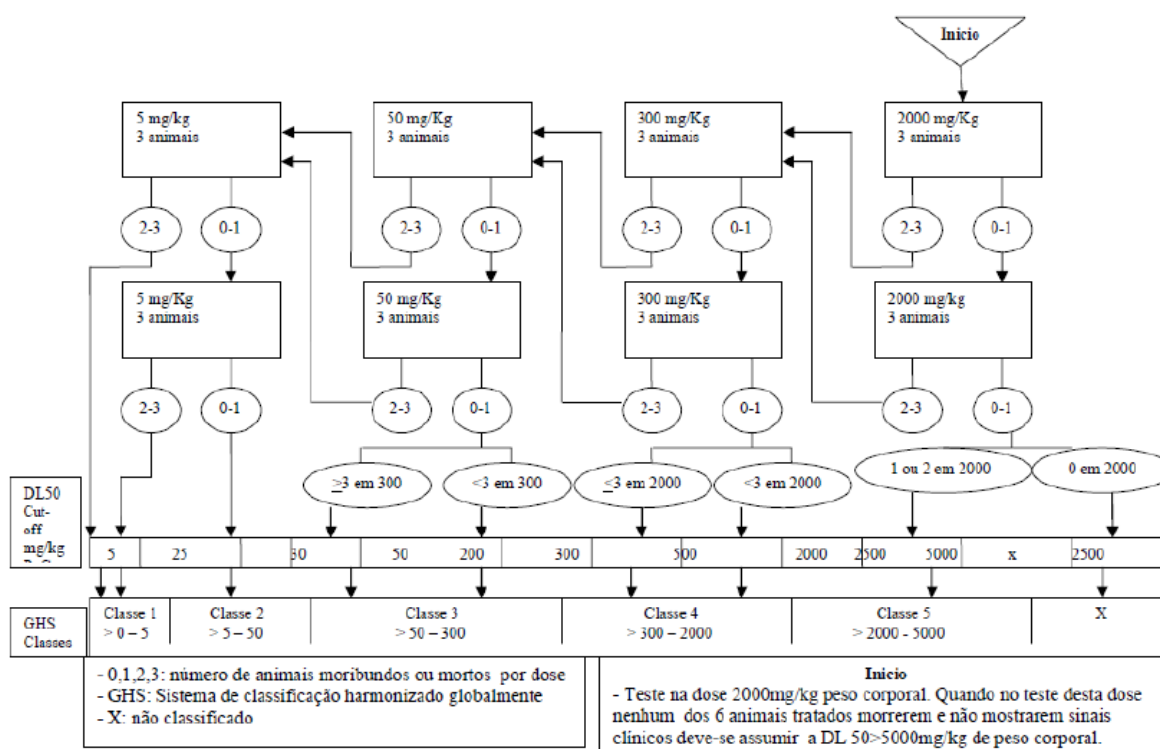
O controle positivo cloreto de benzalcônio, composto altamente irritante às células oculares, classificado na categoria UN GHS 1, promoveu reduzida viabilidade celular de 2,7 e 5,6% nas concentrações de 5,0 e 0,05%, respectivamente. Em contraste, o LQFM184 (20) foi incapaz de reduzir significativamente a viabilidade das células SIRC em ambas as concentrações. Desta forma, o candidato a protótipo fotoprotetor LQFM184 (20) parece não promover irritação ocular ou lesões oculares graves, assim como é preconizado para compostos de uso cosmético, uma vez que a avaliação de parâmetros toxicológicos como irritação ocular faz-se necessário para viabilizar a inclusão deste em produtos cosméticos (ANVISA, 2012b; INOMATA, 2014).

5.9.2 Avaliação da citotoxicidade basal *in vitro* para estimar DL₅₀ através do método de captação do corante vermelho neutro

O corante vermelho neutro é utilizado como indicador de citotoxicidade, uma vez que acumula-se nos lisossomos de células viáveis. Este penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos, inclusive fosfatos hidrofóbicos, na matriz lisossomal (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Por se tratar de metodologia amplamente difundida no meio científico, reprodutível, de fácil execução e de baixo custo, o ensaio vermelho neutro pode ser empregado para auxiliar a escolha da dose na avaliação da toxicidade oral aguda (OECD, 2001).

Segundo o guia OECD 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001, a toxicidade é classificada em 5 categorias: classe 5 ($2000 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL}_{50} \leq 5000 \text{ mg/Kg}$), classe 4 ($300 \leq \text{DL}_{50} < 2000 \text{ mg/Kg}$), classe 3 ($50 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL}_{50} < 300 \text{ mg/Kg}$), classe 2 ($5 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL}_{50} < 50 \text{ mg/Kg}$) e classe 1 (dose < 5 mg/Kg) caracterizando uma amostra altamente tóxica (**Figura 49**).

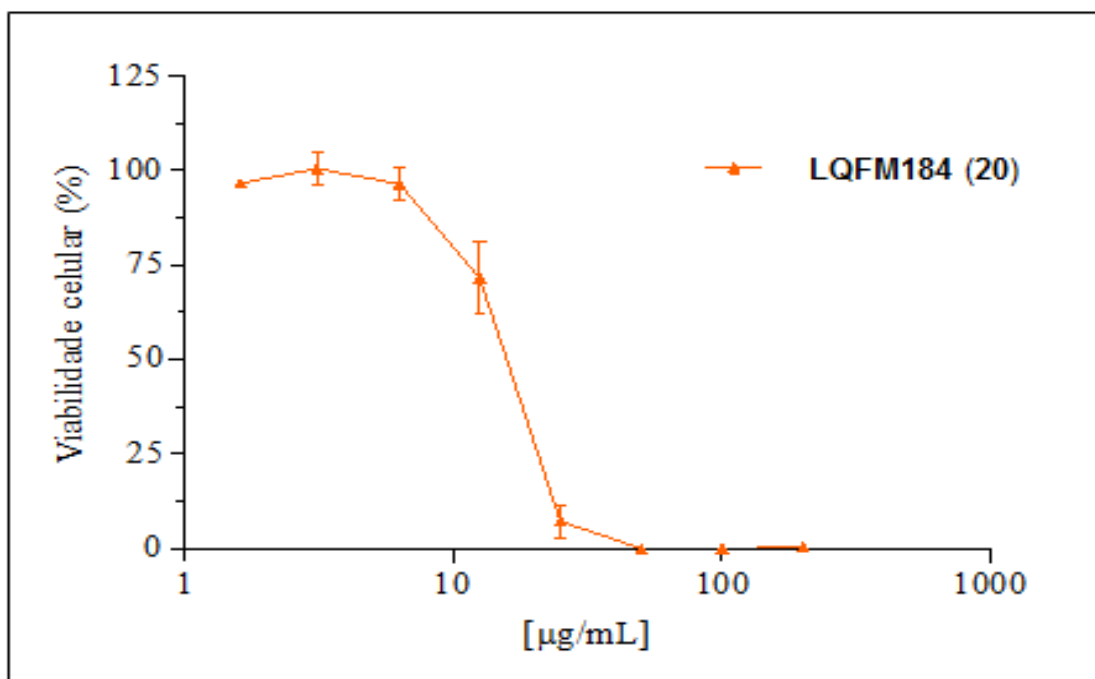
Figura 49 - Classificação da toxicidade oral aguda iniciando com a dose de 2000 mg/Kg conforme OECD 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001.



Fonte: Adaptado de OECD, 2001.

Desta forma, a exposição das células 3T3 a diferentes concentrações do LQFM184 (20) (1,6–200 µg/mL) por 48 h promoveu redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente, obtendo valor de $CI_{50} = 15,2 \mu\text{g/mL}$ (0,02 mM) (Figura 50). A partir desse valor encontrado, a DL_{50} foi estimada em 495,4 mg/kg, sendo o composto LQFM184 (20) classificado na categoria 4 ($300 \leq DL_{50} < 2000$ mg/kg) do sistema GHS de baixa toxicidade (OECD, 2001), assim como os fotoproterores comerciais Tinosorb® M (10), Tinosorb® S (11) e Uvinul T150® (13) (SHAATH, 2007).

Figura 50 - Avaliação da citotoxicidade basal *in vitro* do LQFM184 (**20**) em células 3T3. As células foram expostas a diferentes concentrações da substância-teste (1,6-200 $\mu\text{g/mL}$) e, após 48 h, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de captação do vermelho neutro.



6 CONCLUSÕES

Pelo exposto ao longo deste trabalho, podemos concluir que o planejamento estrutural do LQFM184 (**20**) levou à obtenção do composto constituído por cromóforos absorvedores de radiação UVB e UVA, além de possuir peso molecular igual a 729,65 Da, fato este que segundo alguns autores minimizam ou mesmo impedem a absorção percutânea.

A rota sintética proposta para a construção do composto LQFM184 (**20**), objeto de estudo deste trabalho, se mostrou eficiente, uma vez que o mesmo foi obtido em grau de pureza adequado e com rendimento global de 53% após três etapas. Vale salientar que a primeira etapa sintética foi obtida com um rendimento (92%) maior ao descrito pela literatura, além de ter sido efetuada em ambiente aquoso; estando de acordo com as tendências atuais da química verde, principalmente quando se objetiva produzir produto tecnológico de interesse industrial para uso tópico; assim como a segunda etapa apresentou rendimento de 93% e não foi utilizado solvente orgânico na obtenção do produto.

As técnicas de RMN e IV mostraram-se eficientes na caracterização estrutural do composto LQFM184 (**20**), ao passo que possibilitaram identificar e quantificar os grupos funcionais modificados. Além disso, a técnica de EM foi crucial para a confirmação da identidade estrutural do composto LQFM184 (**20**).

Adicionalmente, a partir dos descritores espectrofotométricos de absorção e emissão, o composto LQFM184 (**20**) apresentou comprimentos de onda máximos na faixa da UVB e UVA, mostrando-se um absorvedor do UV de amplo espectro, semelhante aos fotoprotetores comerciais Tinosorb® M e Tinosorb® S e ao LQFM048 (**14**). Além disso, apresentou valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) acima de 10^4 , caracterizando-o como eficiente absorvedor na região do UV. Quanto à espectroscopia de fluorescência o composto LQFM184 (**20**) apresentou pico máximo de emissão em 448 nm com deslocamento batocrômico em relação à absorção na região do UV, emitindo o excesso de radiação absorvida em comprimentos de onda maiores e menos energéticos.

O composto LQFM184 (**20**) se mostrou estável frente a reações redox quando submetido aos ensaios de voltametria cíclica, uma vez que apresentou baixos potenciais oxidativos e redutivos. Frente aos ensaios de análise térmica termogravimétrica, o mesmo também se manteve estável, pois demonstrou

degradação em temperaturas próximas de 226°C com perda de massa inicial de 14,2%, visto que seu ponto de fusão ocorre em 147°C.

Por conseguinte, o composto LQFM184 (**20**) apresentou valor de FPS *in vitro* para o UVB superior ao fotoprotetor comercial *para*-metoxicinamato de octila (**4**), sendo que ambos os compostos foram preparados sob as mesmas condições de acordo com a metodologia desenvolvida por Mansur e colaboradores.

Quanto ao perfil toxicológico, o composto não tem potencial de promover irritação ocular ou lesões oculares graves quando em contato com células de córnea de coelho SIRC durante o ensaio de citotoxicidade STE preconizado pela OECD 491. Além disso, o valor de DL₅₀ foi estimado em 495,4 mg/kg, de modo que o composto LQFM184 (**20**) foi classificado na categoria 4 do sistema GHS conforme OECD 423, de baixa toxicidade.

Neste sentido, podemos concluir que o planejamento, a síntese, a caracterização estrutural, a avaliação *in vitro* do efeito FPS, de toxicidade ocular e de citotoxicidade basal para o composto LQFM184 (**20**) foram adequados e atendem plenamente às expectativas quanto ao desenvolvimento preliminar de novo composto com perfil fotoprotetor orgânico originalmente desenhado.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, temos a obtenção do composto LQFM184 (**20**) em maior quantidade para desenvolvermos formulação farmacêutica do mesmo.

Para a elucidação estrutural complementar, estamos aguardando a resolução da estrutura através da difração de raios X de monocristais e iremos fazer um estudo complementar de degradação em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por arranjo de diodos (HPLC-PDA).

Para concluir a parte relativa à estabilidade, ainda é necessário a realização de ensaios de fotoestabilidade, além de ensaios de toxicidade aguda *in vivo*, bem com ensaios de absorção percutânea e de biodisponibilidade.

REFERÊNCIAS

- AAD. American Academy of Dermatology. **Sunscreens**. 2015. Disponível em: www.aad.org/media-resources/stats-and-facts/prevention-and-care/sunscreens. Acesso em: 27 set. 2015.
- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do Setor 2016**. 2016. Disponível em: www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2015/04/2015-panorama-do-setor-português-31mar2015.pdf. Acesso em: 22 jun. 2016.
- ACS. American Cancer Society. **Skin Cancer Facts**. 2015. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>. Acesso em: 27 set. 2015.
- ADAD, M. C. B. T. **Determinação do fator de proteção solar “in vitro”**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- AKRMAN, J.; KUBAC, L.; BENDO VÁ, H.; JIROVA, D.; KEJLOVA, K. Quartz plates for determining sun protection *in vitro* and testing photostability of commercial sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v.31, n.2, p.119-129, 2009.
- ANVISA. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 47, de 16 de março de 2006. **Aprova o Regulamento técnico Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes**. 2006. Disponível em: <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/download/category/126cosmeticos>. Acesso em: 23 abr. 2015.
- ANVISA. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 30, de 01 de junho de 2012. **Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências**. 2012a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.pdf. Acesso em: 23 abr. 2015.
- ANVISA. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed., Brasília, 2012b.
- ARGOM. Australian Government. Department of Health and Ageing. Therapeutic Goods Administration. **Australian regulatory guidelines for sunscreens**. Guideline version 1.1, January 2016.
- ASHBY, J.; TINWELL, H.; PLAUTZ, J.; TWOMEY, K.; LEFEVRE, P. A. Lack of binding to isolated estrogen or androgen receptors, and inactivity in the immature rat uterotrophic assay, of the ultraviolet sunscreen filters Tinosorb M-active and Tinosorb S. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.34, n.3, p.287-91, 2001.
- ATKINS, P. W. **Physical Chemistry**. 5. ed., Oxford: Oxford University Press, 1994.

- ÁVILA, R. I.; VIEIRA M. S.; GAETI, M. P.; CLERES, L.; BRITO, L. R.; BATISTA, A. C.; VINHAL, D. C.; OLIVEIRA, G. A.; MENEGATTI, R.; VALADARES, M. C. Toxicity evaluation of LQFM048, a novel photoprotective compound synthesized through green chemistry approach, **Toxicology**, *in press*, accepted manuscript, available online 26 april 2016.
- BARTH, A. L. **Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos**: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos. 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- BASF. **Technical Bulletin-Uvinul grades and Z-cote**. 2002. Disponível em: <http://www.basf.com.br/default.asp?id=3934>. Acesso em: 24 jul. 2015.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. **Medical Biochemistry**. 2. ed. Elsevier Mosby, 2005.
- BIODERMA, 2011. Disponível em: <http://www.bioderma.com/fr/in-touch-with-your-skin/the-skin-is-an-organ.html>. Acesso em: 28 set. 2011.
- BLEASEL, M. D.; ALDOUS, S. *In vitro* evaluation of sun protection factors of sunscreen agents using a novel UV spectrophotometric technique. **International Journal of Cosmetic Science**, v.30, n.4, p.259-270, 2008.
- BLOTNY, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. **Tetrahedron**, v.62, n.41, p.9507–9522, 2006.
- BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. The Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Experimental Dermatology**, v.9, n.3, p.165-169, 2000.
- BOSCH, R.; PHILIPS, N.; SUÁREZ-PÉREZ, J. A.; JUARRANZ, A.; DEVMURARI, A.; CHALENSOUK-KHAOSAAT, J.; GONZÁLEZ, S. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. **Antioxidants**, v.4, n.2, p.248-268, 2015.
- BOTTA, C.; LABILLE, J.; AUFFAN, M.; BORSCHNECK, D.; MICHE, H.; CABIÉ, M.; MASON, A.; ROSE, J. BOTTERO, J. TiO₂-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. **Environmental Pollution**, v.159, n.6, p.1543-1550, 2011.
- BRESLOW, R. Hydrophobic Effects on Simple Organic Reactions in Water. **Accounts of Chemical Research**, v.24, n.6, p.159-164, 1991.
- BYTHROW, J. D. Historical perspective Vanilla as a medicinal plant. **Seminars in Integrative Medicine**, v.3, p.129-131, 2005.
- CALAFAT, A. M.; WONG, L. Y.; YE, X.; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. L. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v.116, n. 7, p.893-7, 2008.
- CHAUDHURI, R. **Sunscreen compositions containing a UV-A sunscreen and photostabilizers and antioxidants**. MERCK U.S. Company. Patent n. 0059258. United States Patent, 2007.

- CHEDEKEL, M. R. A melanina pode melhorar os filtros solares. **Cosmetics and Toiletries**, v.10, p.60-69, 1998.
- CIBA. Specialty Chemicals Corporation (Tarrytown, NY, US). Georges Metzger, Dieter Reinehr, Helmut Luther. **Triazine Derivatives**. US 6193960 B1, 27 fev. 2001.
- CIBA. Specialty Chemicals Holding Inc. EHLIS, T.; MÜLLER, S.; HAYOZ, P. **Symmetrical triazine derivatives**. WO 2004085412 A2, 7 out. 2004.
- COLE, C. Sunscreen protection in the ultraviolet A region: how to measure the effectiveness. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v.17, p.2-10, 2001.
- COLIPA. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association. **In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products**. Guideline, June 2009.
- COLIPA. The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association. **Method for the in vitro determination of UVA protection provided by sunscreen products**. Guideline, 2007.
- COUTEAU, C.; PAPARIS E.; CHAUVET, C.; COIFFARD, L. Tris-biphenyl triazine, a new ultraviolet filter studied in terms of photoprotective efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.487, n.1-2, p.120-3, 2015.
- DATAMONITOR. Personal Hygiene/Personal Care: United States Industry Guide. **Sunscreen Manufacturing in the US**. 2014. Disponível em: http://www.researchandmarkets.com/reports/2392208/sunscreen_manufacturing_in_the_us#pos-0. Acesso em: 13 set. 2015.
- DE ARAUJO, T. S.; DE SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v.4, n.11, p.4807, 2008.
- DE PAOLA, M. V. R. V.; RIBEIRO, M. E. Interação entre filtros solares: avaliação *in vitro* de efeito sinérgico. **Cosmetics and Toiletries**, v.10, p.40-50, 1998.
- DIFFEY, B. L.; LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1997, p.589–600.
- DIFFEY, B. L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.40, p.127-33, 1989.
- DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.43, p.1024-1035, 2000.
- DOEBNER, O. Synthese der Sorbinsäure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.33, n.2, p.2140-2142, 1900.

- DUAN, H.; WANG, L.; QIN, D.; LI, X.; WANG, S.; ZHANG, Y. Synthesis and characterization of some new star-shaped polydentate ligands from 2,4,6-trichloro-2,3,5-triazine. **Synthetic Communications**, v.41, p.380-38, 2011.
- DURÁN-GINER, N.; ENCINAS, S.; MIRANDA, M. A. Solar filters as feasible acceptors of atomic oxygen. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.12, n.5, p.725-8, 2013.
- DUTRA, E. A.; OLIVEIRA, D. A. G. da C.; KEDOR- HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.3, p.381-385, 2004.
- ENCHEV, V.; ANGELOV, I.; MANTAREVA, V.; MARKOVA, N. 2-Carbamido-1,3-Indandione - A Fluorescent Molecular Probe and Sunscreen Candidate. **Journal of Fluorescence**, v.25, n.5, p.1601-1614, 2015.
- EPSTEIN, J. H. Biological effect of sunlight. In: LOWE, N. J.; SHAATH, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect**. New York: Marcel Dekker, 1990.
- EUROPEAN COMMISSION. Council Directive of the EC (76/768/EEC). **List of the permitted UV filters which cosmetic products may contain**. Annex VII. 2005; 011.002: 102-04. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20050218:EN:PDF>>. Acesso em: 20 nov. 2015.
- FDA. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. **Sunscreen drug products for over the counter use: final monograph**. Fed. Reg., v.64, p.27666-93, 1999. Disponível em: <http://www.fda.gov/default.htm>. Acesso em: 25 maio 2015.
- FDA. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. **Labeling and Effectiveness Testing; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; final monograph**, 2011. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2011-06-17/pdf/2011-14766.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2015.
- FDA. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. **Rulemaking History for OTC Sunscreen Drug Products**. 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/Over-the-CounterOTCDrugs/StatusofOTCRulemakings/ucm072134.htm#Original>. Acesso em: 10 jun. 2016.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v.30, n.1, p.153-158, 2007.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, n.2, p.171-177, 2006.

- GARCIA, S.; SANTOS, E. P. Avaliação do FPS de produtos comerciais por método *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.71, n.4, p.99, 1990.
- GAROLI, D.; PELIZZO, M. G.; NICOLOSI, P.; PESERICO, A.; TONIN, E.; ALAIBAC, M. Effectiveness of different substrate materials for *in vitro* sunscreen tests. **Journal of Dermatological Science**, v.56, p.89-98, 2009.
- GASPARRO, F. P.; MITCHNICK, M.; NASH, J. F. A Review of Sunscreen Safety and Efficacy. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, n.3, p.243-56, 1998.
- GILBERT, E.; PIROT, F.; BERTHOLLE, V.; ROUSSEL, L.; FALSON, F.; PADOIS, K. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v.35, n.3, p.208-19, 2013.
- GILLAM, A. E.; STERN, E. S. **An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy**. 2. ed., London: Edward Arnold, 1957.
- GINESTAR, J. Pigments as photoprotectants. **Cosmetics and Toiletries**, v.118, n.2, p.73-78, 2003.
- GIOKAS, D. L.; SALVADOR, A.; CHISVERT, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.5, p.360-74, 2007.
- GLASER, D. A.; PRODANOVIC, E. **Cosmeceuticals**. Draelos, Z. D., 2. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- GOMES, M. N.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; GARROTE, C. F. D.; DE OLIVEIRA, V.; MENEGATTI, R. Condensation of Ethyl Cyanoacetate with Aromatic Aldehydes in Water, Catalyzed by Morpholine. **Synthetic Communication**, v.41, p.52-57, 2011.
- GONZALEZ, H. Percutaneous absorption with emphasis on sunscreens. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, n.4, p.482-8, 2010.
- GONZALEZ-PEREZ, R.; TREBOL, I.; GARCIA-RIO, I.; ARREGUI, M. A.; SOLOETA, R. Allergic contact dermatitis from methylene-bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (Tinosorb M). **Contact Dermatitis**, v.56, p.121, 2007.
- GUARATINI, T.; COLLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C.; LIMA, L. M.; NETO, D. G.; SUSTOVICK, C.; LOPES, N. P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v.32, n.3, p.717-721, 2009.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs and Aging**, v.18, n.9, p.685-716, 2001.
- HEENEN, M.; GIACOMONI, P. U.; GOLSTEIN, P. Individual variations in the correlation between erythral threshold, UV-induced DNA damage and sunburn cell formation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.63, p.84-87, 2001.

- HERZOG, B.; HUEGLIN, D.; OSTERWALDER, U. New sunscreens actives. In: SHAATH, N. A. **Sunscreens: regulations and commercial development**. 3. ed., Nova York: Taylor e Francis, 2005, p.291-320.
- HUONG, S. P.; ANDRIEU, V.; REYNIER, J.-P.; ROCHER, E.; FOURNERON, J.-D. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.186, n.1, p.65-70, 2007.
- ICCVAM. Test method evaluation report (TIMER): *in vitro* cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity test. NIH publication no. 07-4519. Research triangle park, NC: National institute for environmental health sciences. 2006. <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/index.html>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- INCA. Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil em 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em: 13 abr. 2016.
- INOMATA S. Safety assurance of cosmetics in Japan: current situation and future prospects. **Journal of Oleo Science**, v.63, n.1, p.1-6, 2014.
- IONASHIRO, M. **Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 1999.
- ISAAC, V. L. B.; SILVA, T. M. A.; MIGLIATO, K. F.; SALGADO, R. N. Qualidade de creme fotoprotetor A/O. **Cosmetics and Toiletries**, v.17, n.2, p.68-70, 2005.
- JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N. J.; SHAATH, N. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens: development, evaluation, and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1997, p.215-225.
- JCIA. Japan Cosmetic Industry Association. **Measurement Standard for UVA Protection Efficacy**. v.9-14, Toranomon 2-Chome, Minato-Ku Tokyo, 105, 1995.
- JO. Jornal Oficial da União Europeia. **Recomendação da Comissão de 22 de Setembro de 2006 relativa à eficácia e às propriedades reivindicadas dos protetores solares**. JO L 262 de 27.9.1976, p. 169. Diretiva com a última redação que lhe foi dada pela Diretiva 2006/65/CE da Comissão (JO L 198 de 20.7.2006, p. 11).
- KECK, J.; ROESSLER, M.; SCHROEDER, C.; STUEBER, G. J.; WAIBLINGER, F.; STEIN, M.; LEGOURRIEREC, D.; KRAMER, H. E. A.; HOIER, H.; HENKEL, S.; FISCHER, P.; PORT, H.; HIRSCH, T.; RYTZ, G.; HAYOZ, P. Ultraviolet Absorbers of the 2-(2-Hydroxyaryl)-1,3,5-triazine Class and Their Methoxy Derivatives: Fluorescence Spectroscopy and X-ray Structure Analysis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.36, p.6975-6985, 1998.
- KERKER, M. **The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation**. New York: Academic Press, 1969, p.27-188.

- KHOEE, S.; ZAMANI, S. Synthesis, characterization and fluorimetric studies of novel photoactive poly(amide-imide) from anthracene 9-carboxaldehyde and 4,4'-diaminodiphenyl ether by microwave irradiation. **European Polymer Journal**, v.43, n.5, p.2096–2110, 2007.
- KHOURY, E.; NAKANO, A K. **Novo Método para Avaliar Protetores Solares UVA. Cosmetics and Toiletries**,v.19, p.116-119, 2007.
- KHOURY, E.; NAKAZAWA, T. A.; SILVA, A. M. Q. R. Fotoprotetores de alta eficiência. **Cosmetics and Toiletries**, v.7, n.4, p.41-46, 1995.
- KNOEVENAGEL, E. Ueber eine Darstellungsweise der Glutarsäure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.27, n.2, p.2345-2346, 1894.
- KOC, Z. E.; BINGOL, H.; SAF, A. O.; TORLAK, E.; COSKUN, A. Synthesis of novel tripodal-benzimidazole from 2,4,6-tris(p-formylphenoxy)-1,3,5-triazine: structural, electrochemical and antimicrobial studies. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, n.1-3, p.251-255, 2010.
- KOCKLER, J.; OELGEMÖLLER, M.; ROBERTSON, S.; GLASS, B. D. Photostability of Sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, n.13, n.1, p.91-110, 2012.
- KRISHNAN, R.; NORDLUND, T. M. Fluorescence dynamics of three UV-B sunscreens. **Journal of Fluorescence**, v.18, n.1, p.203-17, 2008.
- KUDER, J. E.; LIMBURG, W. W.; Pochan, J. M.; WYCHICK, D. Structural effects on the electrochemistry and charge distribution of mono-, di-, and tri-cyanovinyl aromatic compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v.13, n.13, p. 1643-1651, 1977.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, p.937-58, 2005.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006, 938p.
- LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection: a review. **The Lancet**, v.370, n.9586, p.528-537, 2007.
- LONGSTRETH, J.; DE GRUIJL, F. R.; KRIPKE, M. L.; ABSECK, S.; ARNOLD, F.; SLAPER, H. I.; VELDERS, G.; TAKIZAWA, Y.; VAN DER LEUN, J. C. Health risks. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.46, p.20-39, 1998.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.670-673, 2004.
- LUCAS, R.; MCMICHAEL, T.; SMITH, W.; ARMSTRONG. B.; **Solar ultraviolet radiation: global burden of disease from solar ultraviolet radiation**, Environmental Burden of Disease Series, n.13, World Health Organization: Geneva, 2006.

- LUND, L. P.; TIMMINS, G. S. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: Controversies and potential resolutions. **Pharmacology and Therapeutics**, v.114, n.2, 198-207, 2007.
- MACMANUS-SPENCER, L. A.; TSE, M. L.; KLEIN, J. L.; KRACUNAS, A. E. Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate. **Environmental Science and Technology**, v.45, n.9, p.3931-37, 2011.
- MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreens: A Review of Health Benefits, Regulations, and Controversies. **Dermatologic Clinics**, v.32, n.3, p.427-38, 2014.
- MANSUR, J. de S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. d'A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.61, n.3, p.121-124, 1986.
- MATHEUS, L. G. M.; KUREBAYASHI, A. K. **Fotoproteção: a radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos**. São Paulo: Tecnopress, ABC–Associação Brasileira de Cosmetologia, 2002, 72p.
- MATTS, P. J.; ALARD, V.; BROWN, M. W.; FERRERO, L.; GERS-BARLAG, H.; ISSACHAR, N.; MOYAL, D.; WOLBER, R. The COLIPA *in vitro* UVA method: a standard and reproducible measure of sunscreen UVA protection. **International Journal of Cosmetic Science**, v.32, n.1, p.35-46, 2010.
- MCKINLAY, A. F.; DIFFEY, B. L. A reference action spectrum for ultra-violet induced erythema in human skin. In: PASSCHIER, W. F.; BOSNJAKOVICH, B. F. M. **Human Exposure to Ultraviolet Radiation: Risks and Regulations**. International Congress Series, Elsevier, Amsterdam, 1987, p.83–87.
- MENEGATTI, R. Green Chemistry – Aspects for the Knoevenagel Reaction. In: KIDWA, M.; MISHRA, N. K. **Green Chemistry - Environmentally Benign Approaches**. Universidade Federal de Goiás, Brazil: Intech, 2012. p. 13-32.
- MENICAGLI, R.; SAMARITANI, S.; SIGNORE, G.; VAGLINI, F.; VIA, L.D. *In Vitro* Cytotoxic Activities Of 2-Alkyl-4,6-Diheteroalkyl-1,3,5-Triazines: New Molecules In Anticancer Research. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.19, p.4649-4652, 2004.
- MIYACHI, Y. Photoaging from an oxidative standpoint. **Journal of Dermatological Science**, v.9, p.79-86, 1995.
- MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo: Artliber Ed. Ltda, 2009.
- MOYAL, D. D.; FOURTANIER, A. M. Broad spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet–simulated radiation and natural sunlight–induced immunosuppression in human beings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.58, n.5, p.S149-154, 2008.
- MOYAL, D; CHARDON, A; KOLLIAS, N. Determination of UVA protection factors using the persistent pigment darkening (PPD) as the end point. (Part 1). Calibration of the method. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.16, n.6, p.245-9, 2000a.

- MOYAL, D; CHARDON, A; KOLLIAS, N. UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by the persistent pigment darkening (PPD) method. (Part 2). **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.16, n.6, p.250-5, 2000b.
- NASCIMENTO, L. F.; SANTOS, E. P.; AGUIAR, A. P. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica. **Revista Virtual de Química**, v.6, n.2, p.190-223, 2014.
- NASH, J. F.; TANNER, P. R. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology, Photoimmunology And Photomedicine**, v.30, n.2-3, p.88-95, 2014.
- NOHYNEK, G.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.33, n.3, p.285-299, 2001.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. **OECD Guideline for the testing of chemicals**. Test N. 423. Acute oral toxicity: acute toxic class method.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, 2015. **OECD Guideline for the testing of chemicals**. Test N.491: The Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (28/07/2015).
- OLIVEIRA, A. G. da C.; DUTRA, E. A.; SANTORO, M. I. R. M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Protetores Solares, Radiações e Pele. **Cosmetics and Toiletries**, v.16, p.68-72, 2004.
- PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapeutics**, v.20, p.360-76, 2007.
- PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chemical Reviews**, v.96, n.8, p.3147-3176, 1996.
- PATTANAARGSON, S. T.; MUNHAPOL, P.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUNGTHONGARAM, S. Photoisomerization of octylmethoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.161, n.2-3, p.269-274, 2004.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. Norte-Americana, 2010, p.365-398.
- PHRMA. **Researching Cancer Medicines: Setbacks and Stepping Stones**. 2016. Disponível em: <http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/2016-cancer-failures-setbacks.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2016.
- PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.48, n.1, p.1-19, 2003.

- PINNELL, S. R.; FAIRHURST, M. D. D.; GILLIE R.; MITCHNICK, M. A.; KOLLIAS, N. Microfine Zinc Oxide is a Superior Sunscreen Ingredient to Microfine Titanium Dioxide. **Dermatologic Surgery**, v.26, n.4, p.309-14, 2000.
- PISSAVINI, M.; FERRERO, L.; ALARO, V.; HEINRICH, U.; TRONNIER, H.; KOCKOTT, D.; LUTZ, D.; TOURNIER, V.; ZAMBONIN, M.; MELONI, M. Determination of the *in vitro* SPF. **Cosmetics and Toiletries**, v.118, p.63-72, 2003.
- RANGEL, V. L. B. I.; CORRÊA, M. A. Fotoproteção. **Cosmetics and Toiletries**, v.14, p.88-95, 2002.
- REIS, M. I. P.; ROMEIRO, G. A.; DAMASCENO, R. N.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F. Síntese e Aplicações de 1,3,5-Triazinanas. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.2, p.283-299, 2013.
- REZENDE, S. G.; DOURADO, J. G.; LINO F. M. A.; VINHAL, D. C.; SILVA, E. C.; GIL, E. S. Methods Used in Evaluation of the Sun Protection Factor of Sunscreens. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.11, n. 2, p.37-54, 2014.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010, p.101-161.
- RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 2004. 104f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- ROUTABOUL, C; DENIS, A; VINCHE, A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. **European Journal of Dermatology**, v.9, n.2, p.95-9, 1999.
- RUVOLO JÚNIOR, E. C. Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (*in vivo*), FDA, COLIPA, SAA. **Cosmetics On Line**, v.19, n.105, p.37-46, 1997.
- SAID, T.; DUTOT, M.; MARTIN, C.; BEAUDEUX, J.-L.; BOUCHER, C.; ENEE, E.; BAUDOIN, C.; WARNET, J.-M.; RAT, P. Cytoprotective effect against UV-induced DNA damage and oxidative stress: Role of new biological UV filter. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.30, n.3-4, p.203-210, 2007.
- 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.
- SÁNCHEZ, G. M.; DELAPORTE, R. H. **Sol e Saúde: fotoproteção**. 1. ed., São Paulo: Pharmabooks, 2008.
- SANTOS FILHO, P. F.; **Estrutura Atômica & Ligação Química**. 1. ed., Campinas: UNICAMP, 1999.

- SANTOS, A. J. M.; MIRANDA, M. S.; SILVA, J. C. G. E. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. **Water Research**, v.46, n.10, p.3167-76, 2012.
- SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v.29, n.3, p.559-66, 1979.
- SAYRE, R. M.; DOWDY, J. C.; LOTT, D. L.; MARLOWE, E. Commentary on 'UVB-SPF': the SPF labels of sunscreen products convey more than just UVB protection. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v.24, n.4, p.218-20, 2008.
- SBD. Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Relatório da Campanha Nacional de Prevenção ao Câncer de Pele**. 2016. Disponível em: http://sbd.tempsite.ws/capele/gestao/distribuicao_fotoprotecao_sexo.asp?uf=NULL&cidade=NULL&servico=NULL&campanha=3. Acesso em: 10 abr. 2016.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Introdução aos produtos fotoprotetores. **Cosmetics and Toiletries**, v.12, p.60-67, 2000.
- SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. **Chemical Reviews**, v.103, n.5, p.1685–1757, 2003.
- SHAATH, N. A. **The encyclopedia of ultraviolet filters**. New York: White Plains, 2007, 222p.
- SHAATH, N. A. Ultraviolet filters. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.9, p.464-469, 2010.
- SHARROCK, P.; MELNÍK, M. Copper(II) acetates: from dimer to monomer. **Canadian Journal of Chemistry**, v.63, n.1, p.52-56, 1985.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5. ed. Canada: John Wiley & Sons, INC., 1991, p.289-295.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5.ed., Bookman, 2002, 836p.
- SMITH, B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2001.
- SPRINGSTEEN, C.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K. F. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v.380, p.155-164, 1999.
- TIBBETTS, J. Shining a light on BP-3 exposure. **Environmental Health Perspectives**, v.116, n.7, p.A306, 2008.
- TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U.; ROUGIER, A. Novel Emerging Sunscreen Technologies. **Dermatologic Clinics**, v.24, p.105-117, 2006.

- UNITED NATIONS UN (2013). **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1 -117006-1.
- URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.64, n.2-3, p.99-104, 2001.
- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.27-34, 2011.
- VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da Rutina com *p*-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In Vitro* da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Reflectância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-7, 2008.
- VIEIRA, M. S. **Implementação de métodos alternativos ao uso de animais aplicados para investigação de alguns parâmetros de toxicidade e eficácia da molécula fotoprotetora LQFM048**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, 2014.
- VIEIRA, M. S.; de OLIVEIRA, V.; LIMA, E. M.; KATO, M. J.; VALADARES, M. C. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimating acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.63, n.5, p.505-510, 2011.
- VINHAL, D. C.; ÁVILA, R. I.; VIEIRA, M. S.; LUZIN, R. L.; QUINTINO, M. P.; NUNES, L. M.; RIBEIRO, A. C. C.; CAMARGO, H. S.; PINTO, A. C.; SANTOS JÚNIOR, H. M.; CHIARI, B. G.; ISAAC, V.; VALADARES, M. C.; MARTINS, T. D.; LIÃO, L. M.; GIL, E. S.; MENEGATTI, R. Photoprotective effect and acute oral systemic toxicity evaluation of the novel heterocyclic compound LQFM048. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.161, p.50-58, 2016.
- VOLKOVOVA, K.; BILANICOVA, D.; BARTONOVA, A.; LETAŠIOVÁ, S.; DUSINSKA, M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental Health**, v.11(suppl 1), 2012.
- WAIBLINGER, F.; FLUEGGE, A. P.; KECK, J.; STEIN, M.; KRAMER, H. E. A.; LEPPARD, D. Irradiation-dependent equilibrium between open and closed form of UV absorbers of the 2-(2-hydroxyphenyl)-1,3,5-triazine type. **Research on Chemical Intermediates**, v.27, n.1-2, p.5-20, 2001.
- WANG, S. Q.; LIM, H. W. Current status of the sunscreen regulation in the United States: 2011 Food and Drug Administration's final rule on labeling and effectiveness testing. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.65, n.4, p.863-9, 2011.
- WARREN, S.; WYATT, P. **Organic Synthesis: The Disconnection Approach**. 2.ed. Wiley, 2008.

- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International agency for research on cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. v.55. Solar and Ultraviolet Radiation. 11 November 1997. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol55/volume55.pdf>. Acesso em: 04 maio 2015.
- WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, v.19, n.4, p.452-459, 2001.
- XIN, X.; XIANG, D.; YANG, J.; ZHANG, Q.; ZHOU, F.; DONG, D. Homogeneous and stereoselective copper(II)-catalyzed monohydration of methylenemalononitriles to 2-cyanoacrylamides. **The Journal of Organic Chemistry**, v.78, n.23, p.11956-6, 2013.
- YAMAJI, M.; KIDA, M. Photothermal tautomerization of a UV sunscreen (4-tert-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethane) in acetonitrile studied by steady-state and laser flash photolysis. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.117, n.9, p.1946-51, 2013.
- ZACARÍAS, L. G. **Percutaneous Absorption of UV Filters Contained in Sunscreen Cosmetic Products: Development of Analytical Methods**. New York: Springer, 2014. ISBN 978-3-319-01189-9.

GLOSSÁRIO

Anisotropia diamagnética: Fenômeno em que os prótons de uma molécula circulam em direção oposta ao campo magnético aplicado.

Bioisosterismo: Estratégia de modificação molecular para otimização de um composto protótipo baseado na troca de determinado fragmento molecular.

Ceratose actínica: Também chamada de queratose actínica, é uma condição pré-maligna caracterizada pela presença de manchas escamosa espessas na pele a semelhança de verrugas que podem progredir para carcinoma de células escamosas. Está associada a pessoas de pele clara que frequentemente ficam expostas a radiação ultravioleta.

Constante dielétrica: É a razão entre a quantidade de energia elétrica armazenada em um material por uma tensão aplicada, em relação ao armazenado em vácuo.

Cromóforos: São grupos de átomos que possuem a propriedade de absorver energia em comprimentos de onda na região do espectro ultravioleta.

Deslocamento batocrômico: Deslocamento para energia mais baixa ou para comprimento de onda maior, como consequência ocorre emissão de luz vermelha.

Deslocamento hipsocrômico: Deslocamento para energia mais alta ou para comprimento de onda menor, como consequência ocorre emissão de luz azul.

Efeito eritematígeno: Efeito do excesso de exposição à radiação ultravioleta caracterizado por coloração avermelhada da pele em virtude da vasodilatação capilar.

Efeito hiperacrômico: Efeito que leva ao aumento da intensidade de absorção da radiação ultravioleta.

Efeito hipocrômico: Efeito que ocasiona uma redução da intensidade de absorção da radiação ultravioleta.

Efeito pigmentígeno: Estimulação da pigmentação direta e de curta duração da pele.

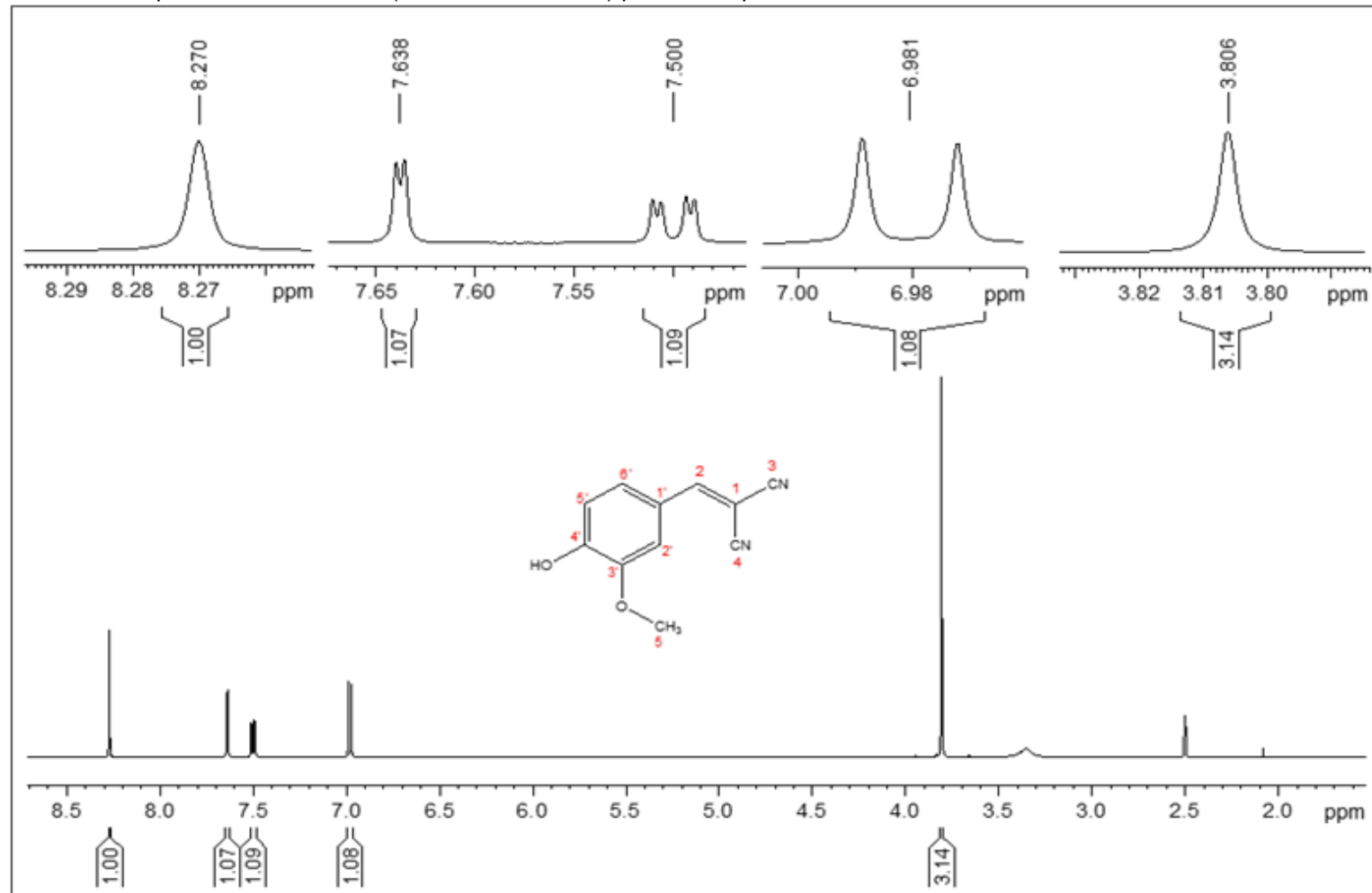
Melanossoma: São estruturas responsáveis pelo acúmulo de melanina.

Peroxidação lipídica: É o processo através do qual as espécies reativas de oxigênio atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidios das membranas das células, desintegrando-as e permitindo desta forma a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares.

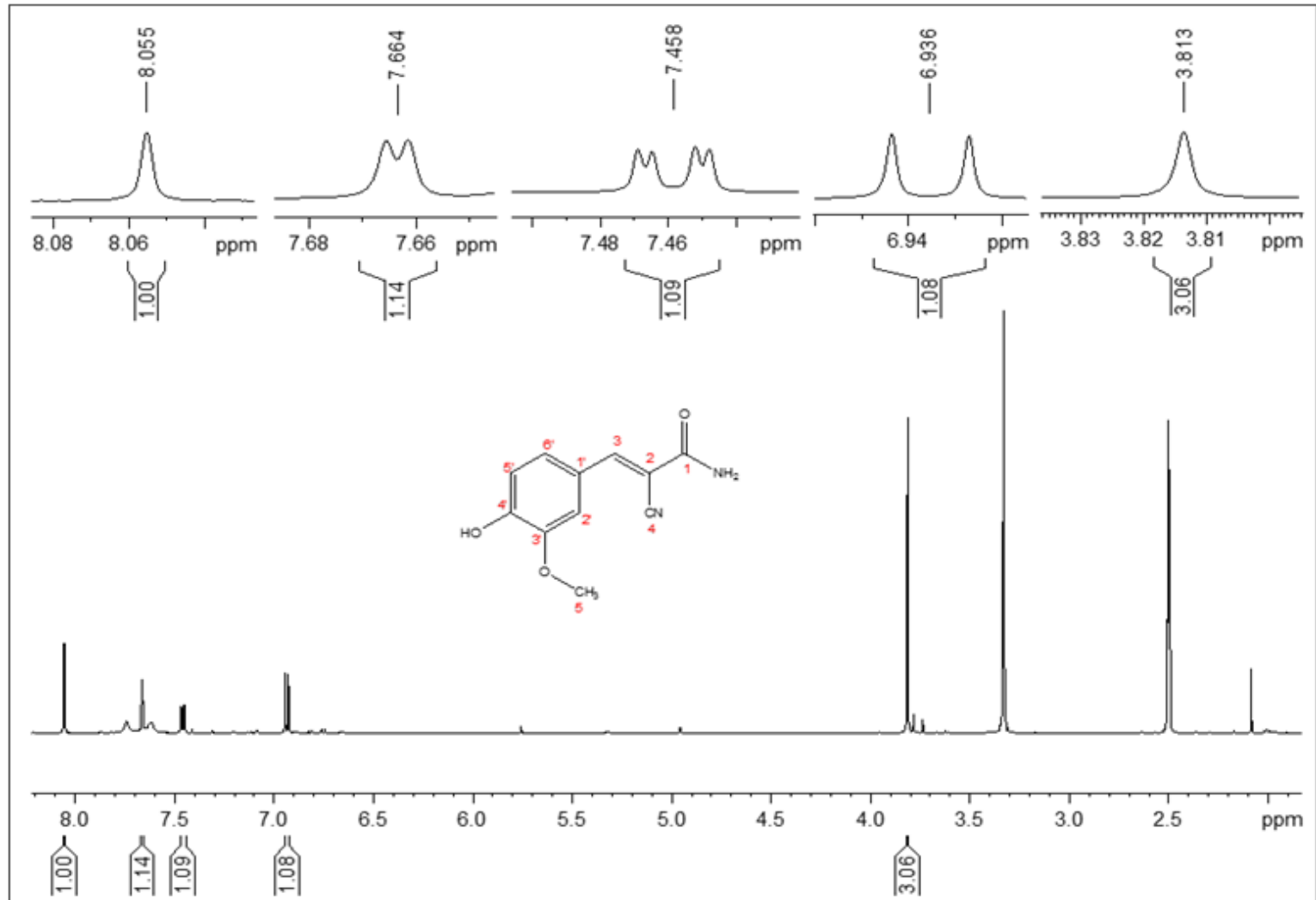
Telangiectasias: São pequenos vasos dilatados na região superficial da pele ou em membranas de mucosas. Podem ocorrer por causas genéticas ou adquiridas, sendo esta última ocasionada por exposição à radiação ultravioleta em excesso.

ANEXOS – ESPECTROS SELECCIONADOS

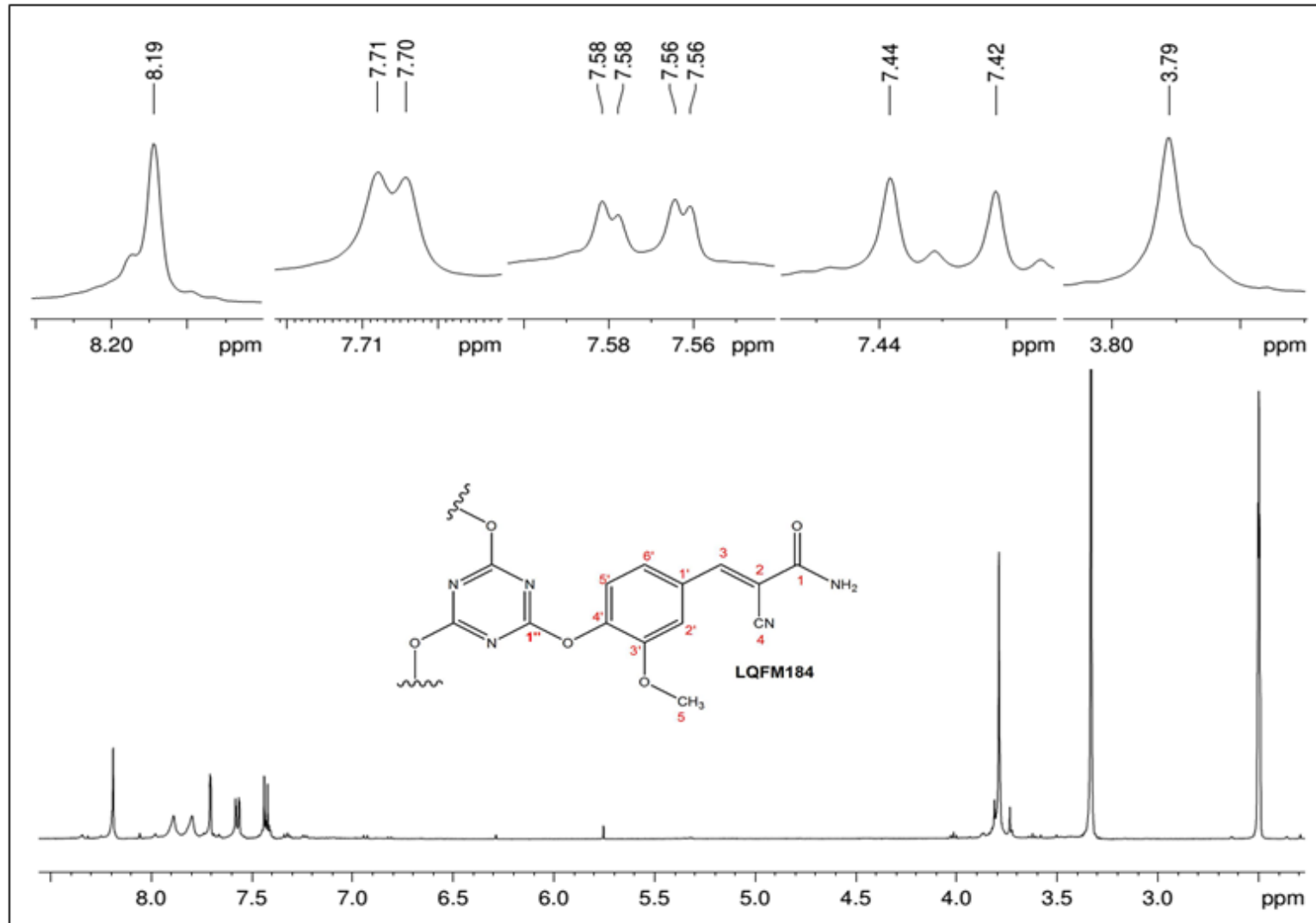
Anexo 1 - Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) para o composto 17.



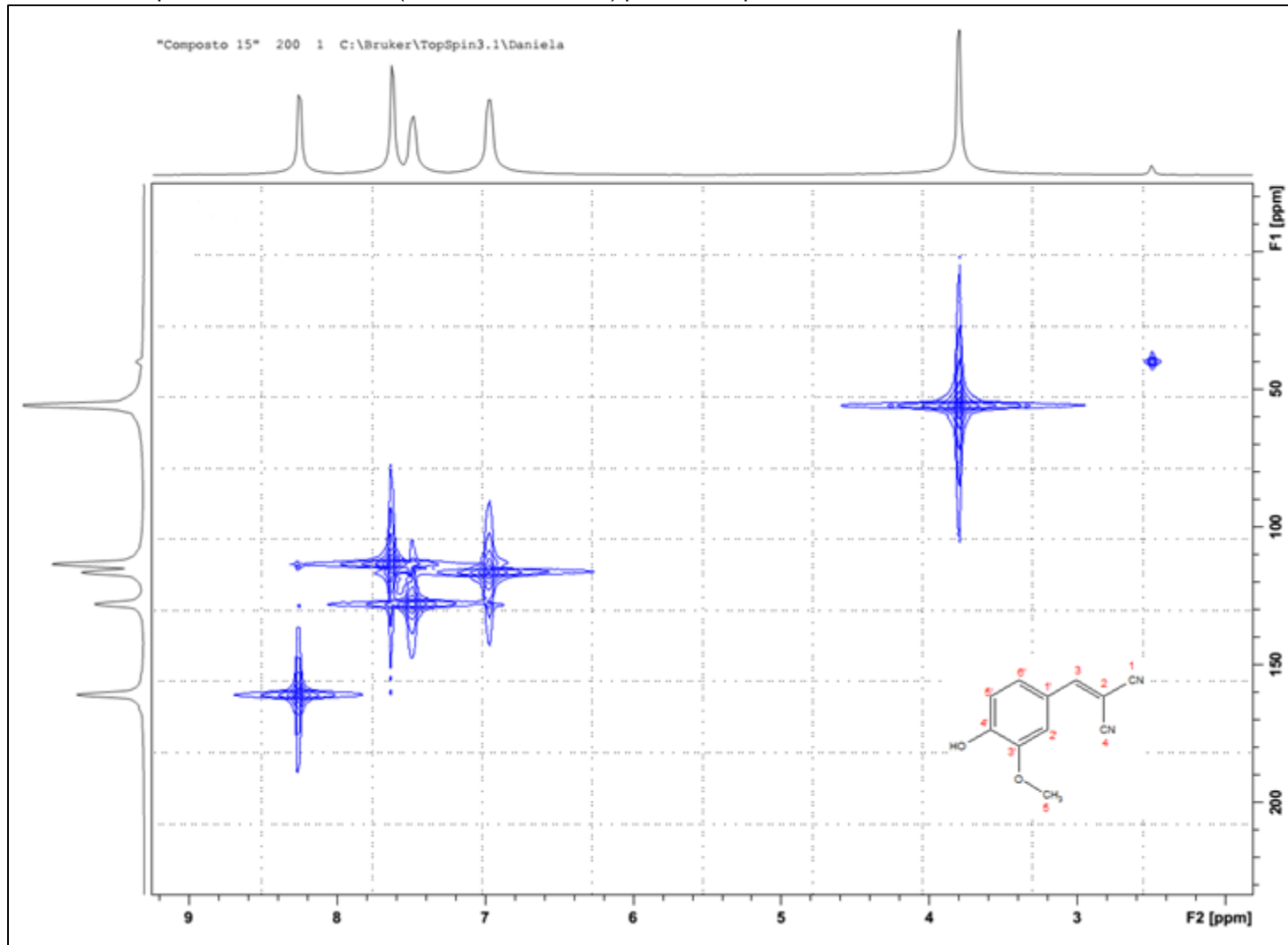
Anexo 2 - Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) para o composto **18**.



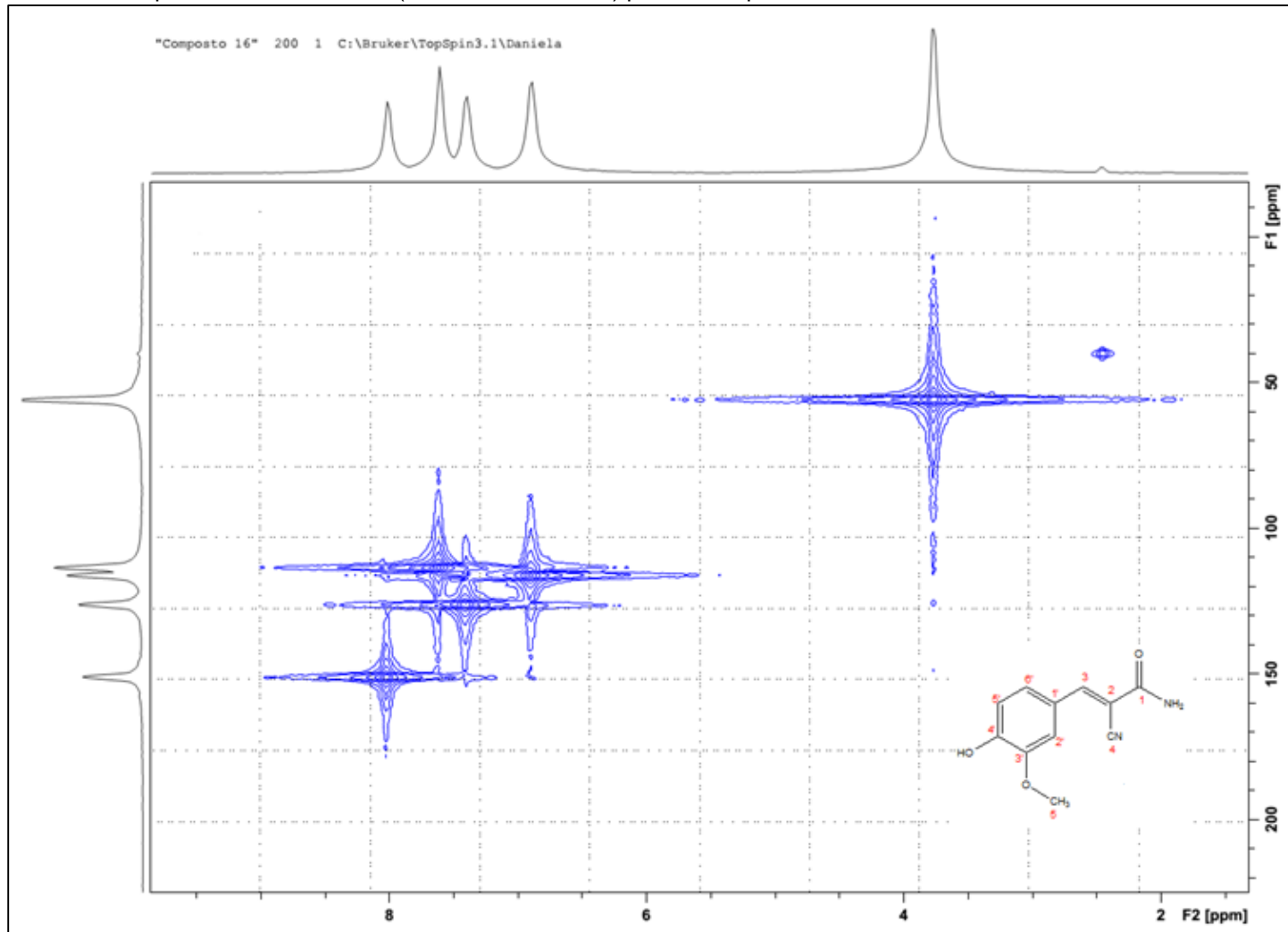
Anexo 3 - Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) para o composto LQFM184 (**20**).



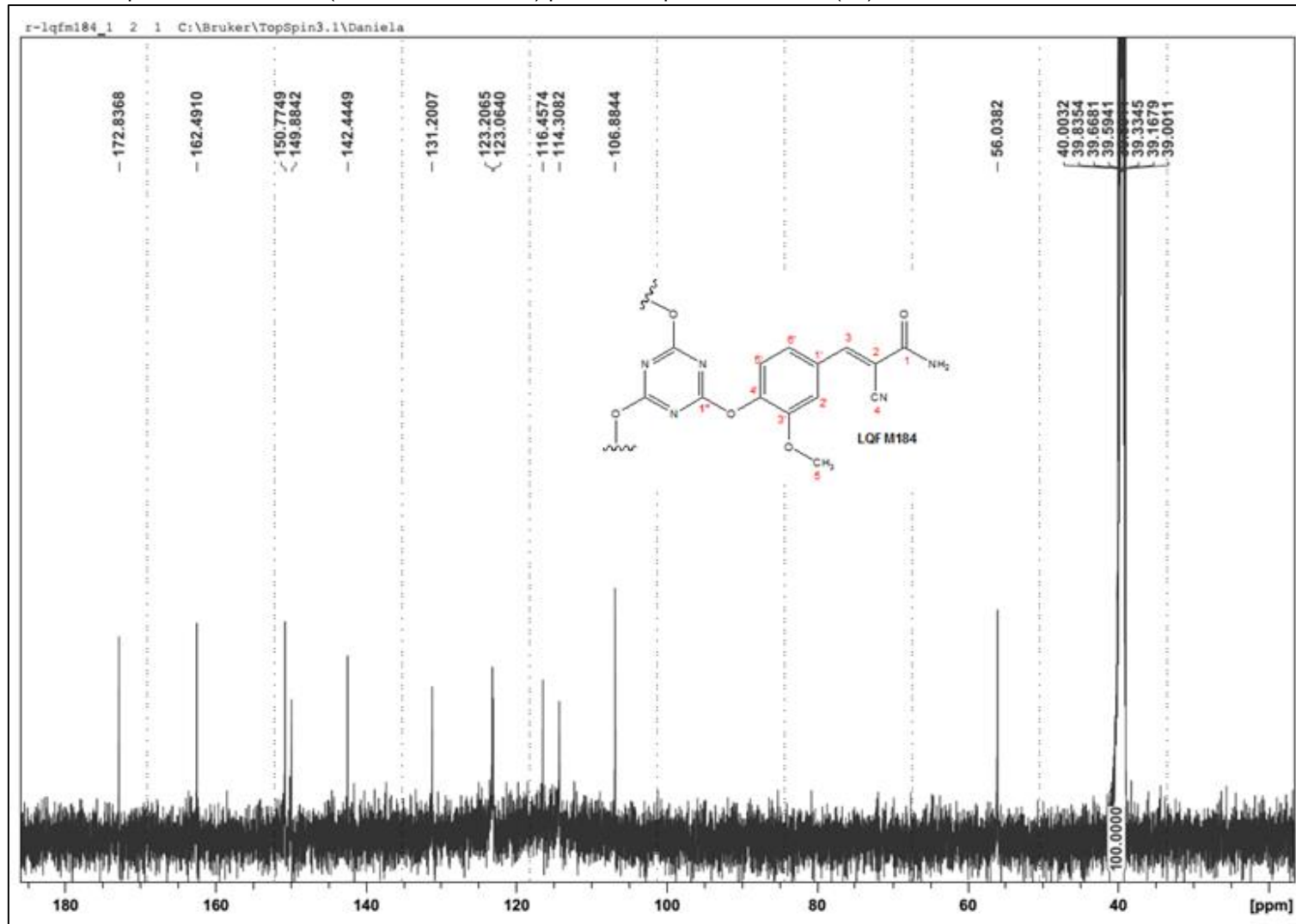
Anexo 4 – Espectro de RMN HSQC (500,13 MHz, CDCl₃) para o composto 17.



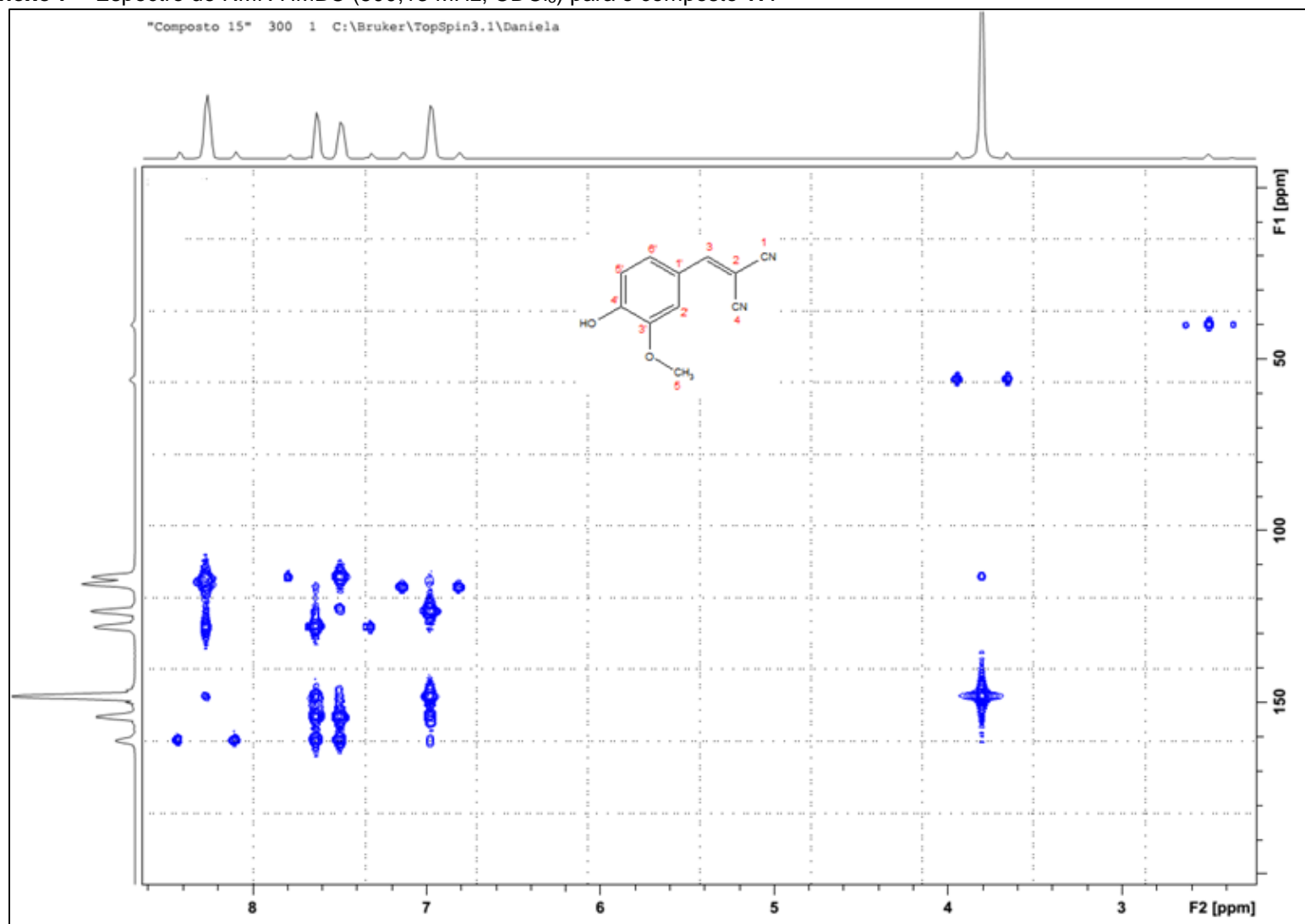
Anexo 5 – Espectro de RMN HSQC (500,13 MHz, CDCl₃) para o composto 18.



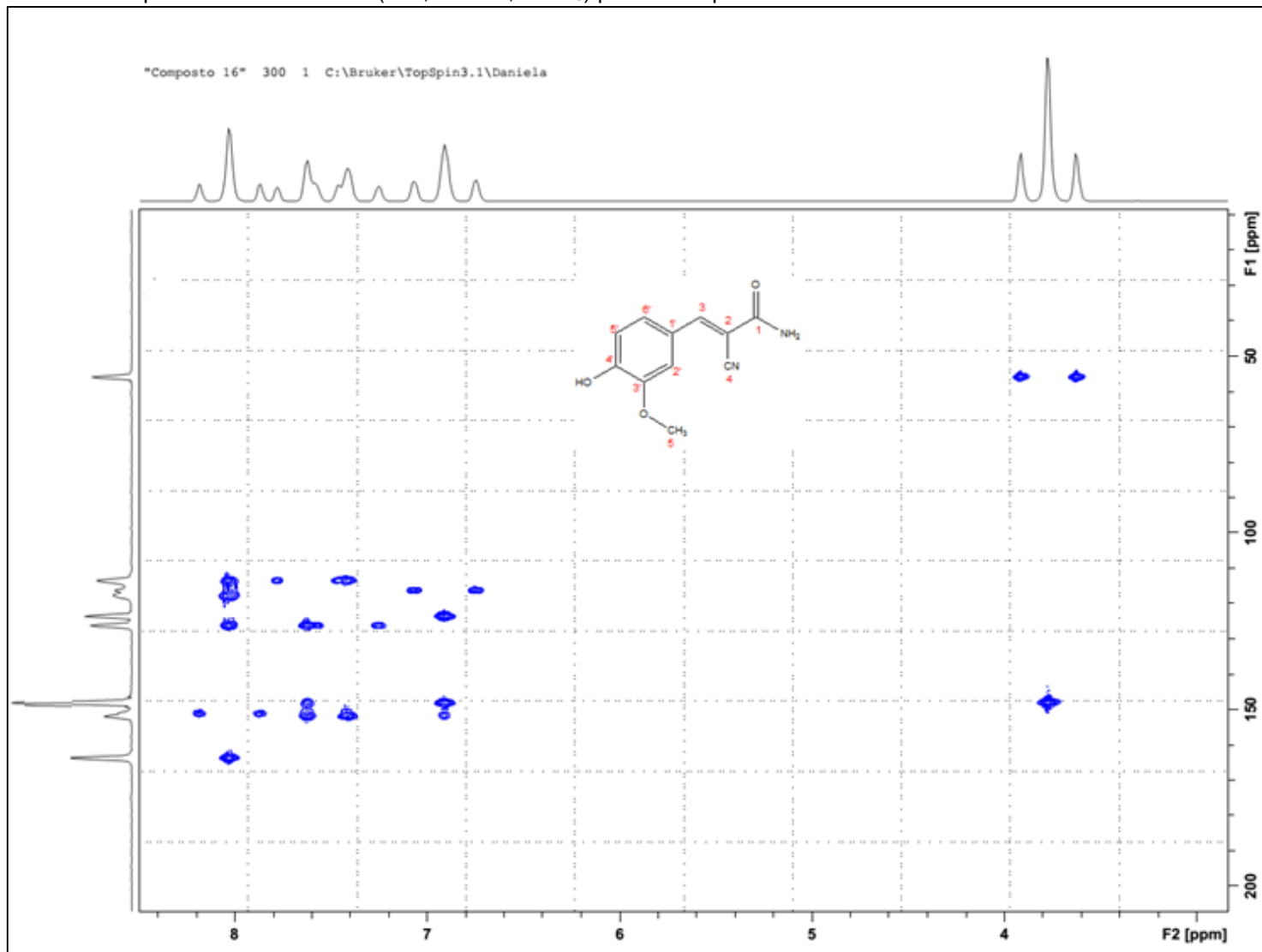
Anexo 6 – Espectro de RMN ^{13}C (500,13 MHz, CDCl_3) para o composto LQFM184 (20).



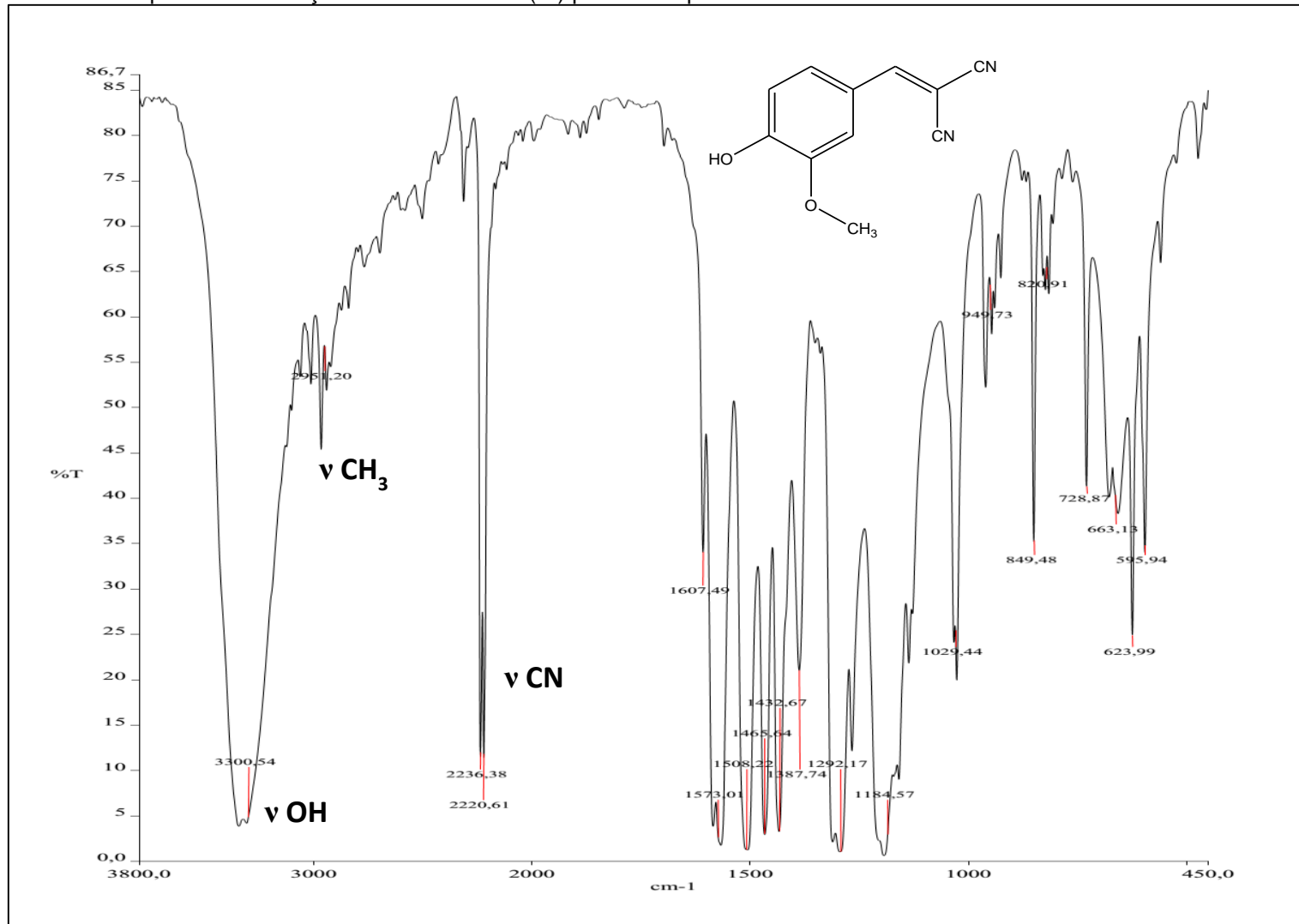
Anexo 7 – Espectro de RMN HMBC (500,13 MHz, CDCl₃) para o composto 17.



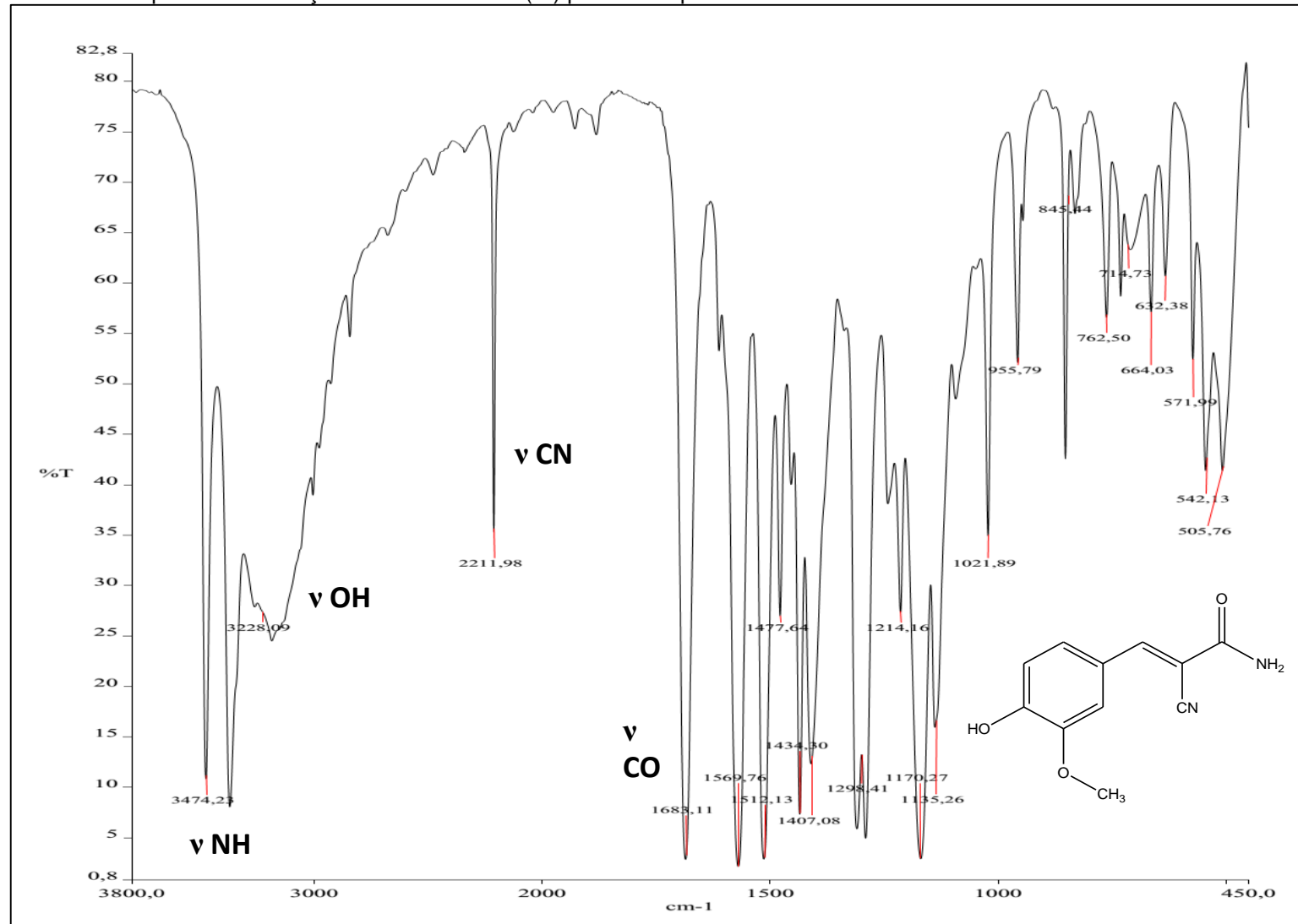
Anexo 8 – Espectro de RMN HMBC (500,13 MHz, CDCl₃) para o composto 18.



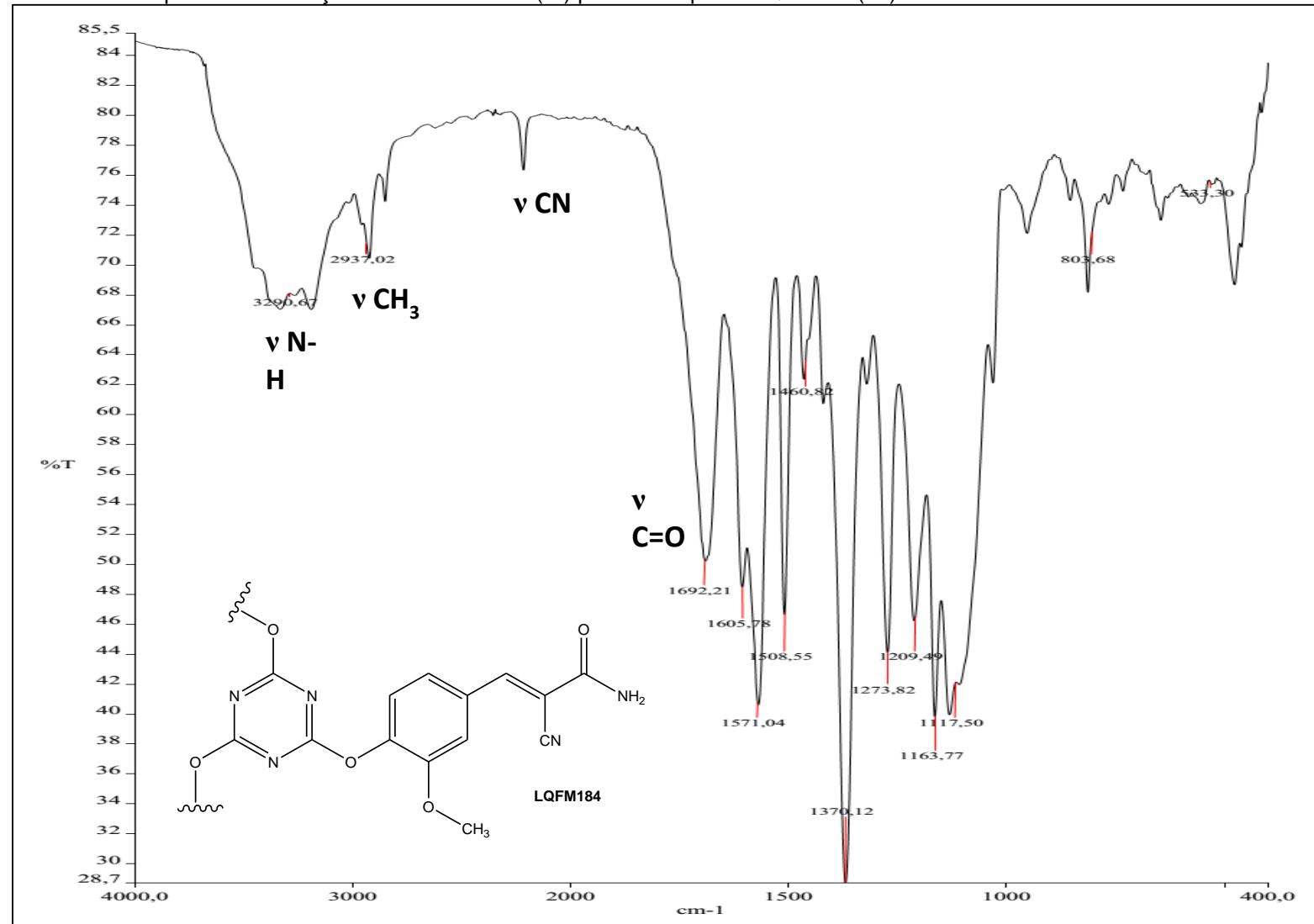
Anexo 9 – Espectro de absorção no infravermelho (IV) para o composto 17.



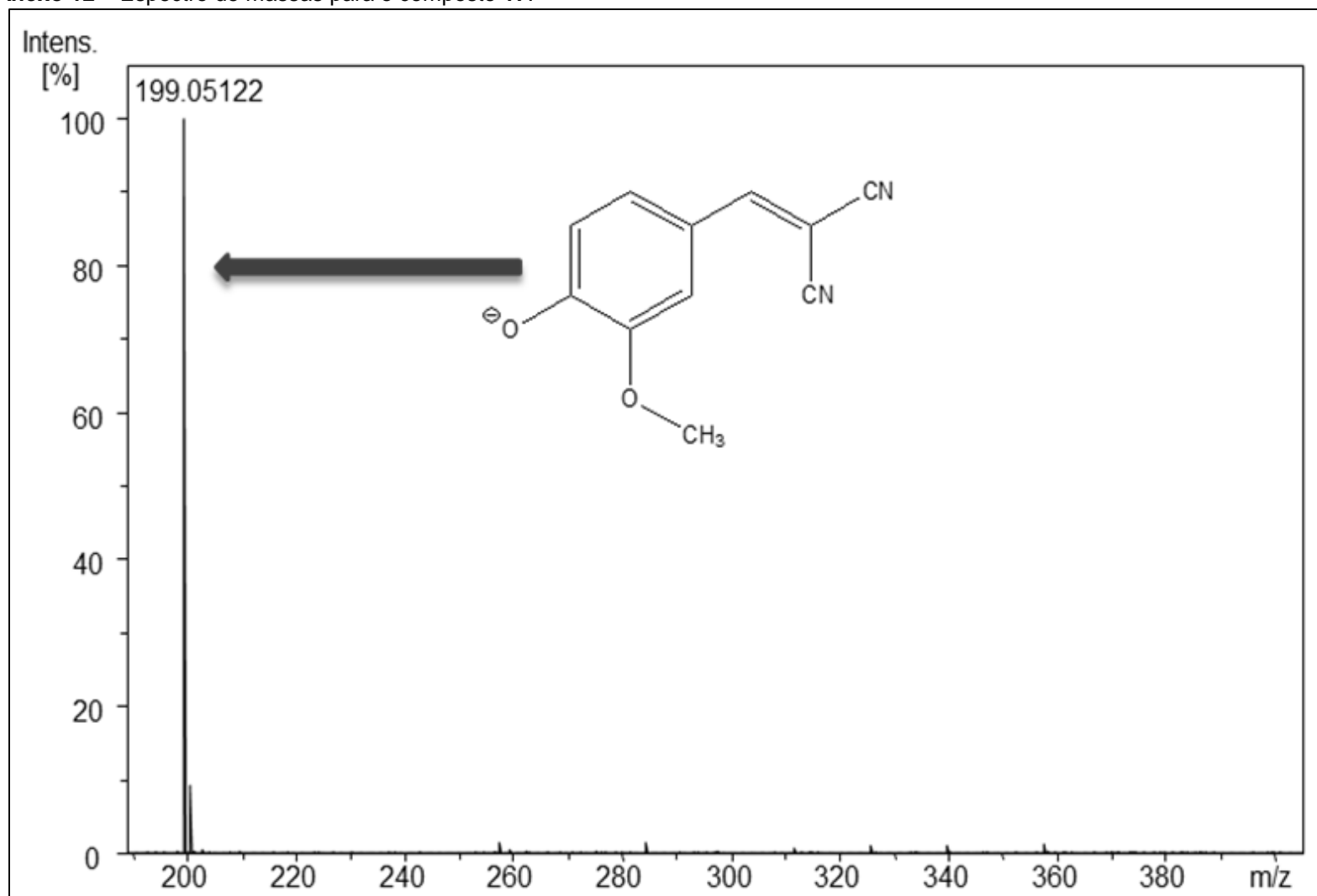
Anexo 10 – Espectro de absorção no infravermelho (IV) para o composto 18.



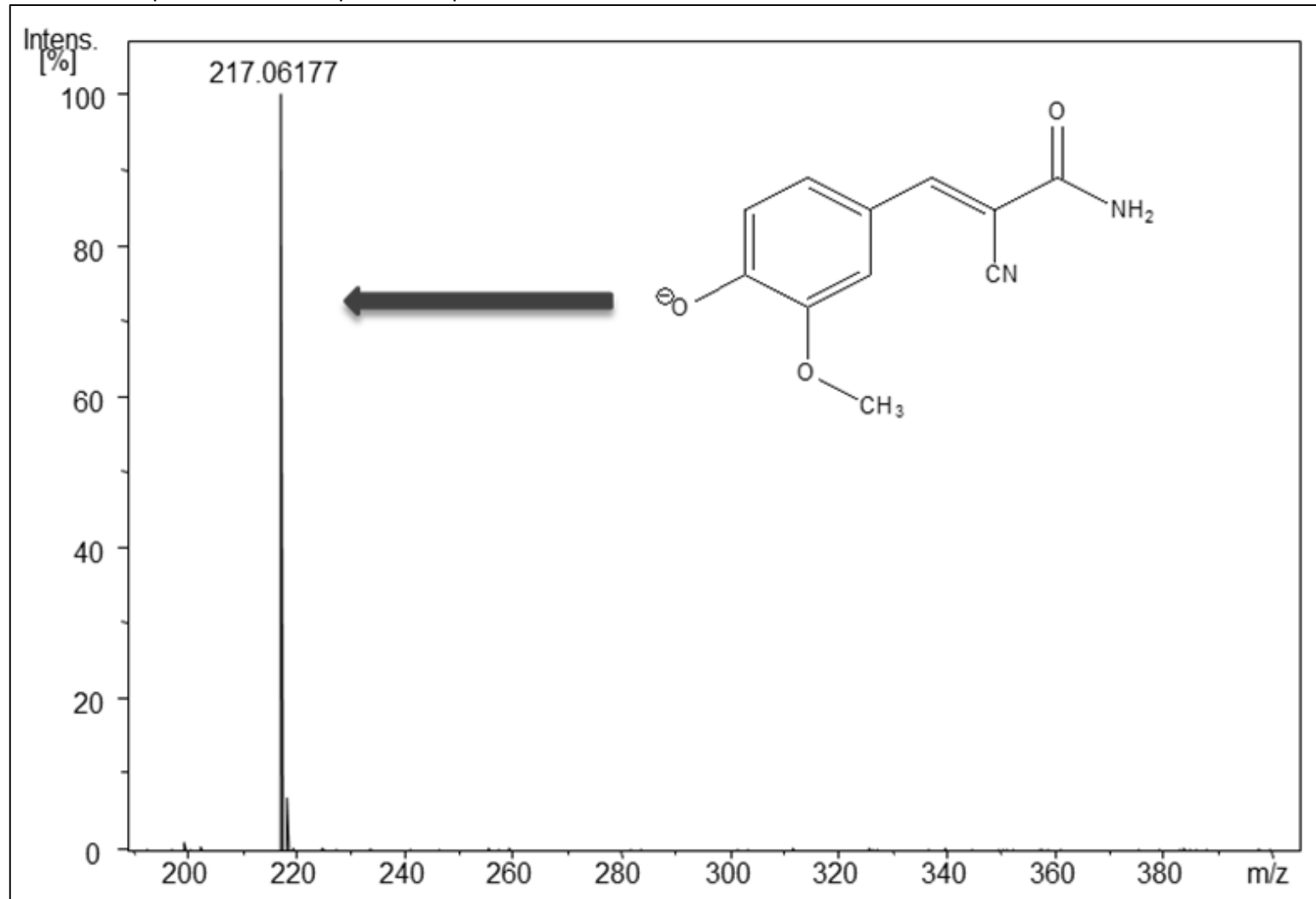
Anexo 11 – Espectro de absorção no infravermelho (IV) para o composto LQFM184 (20).



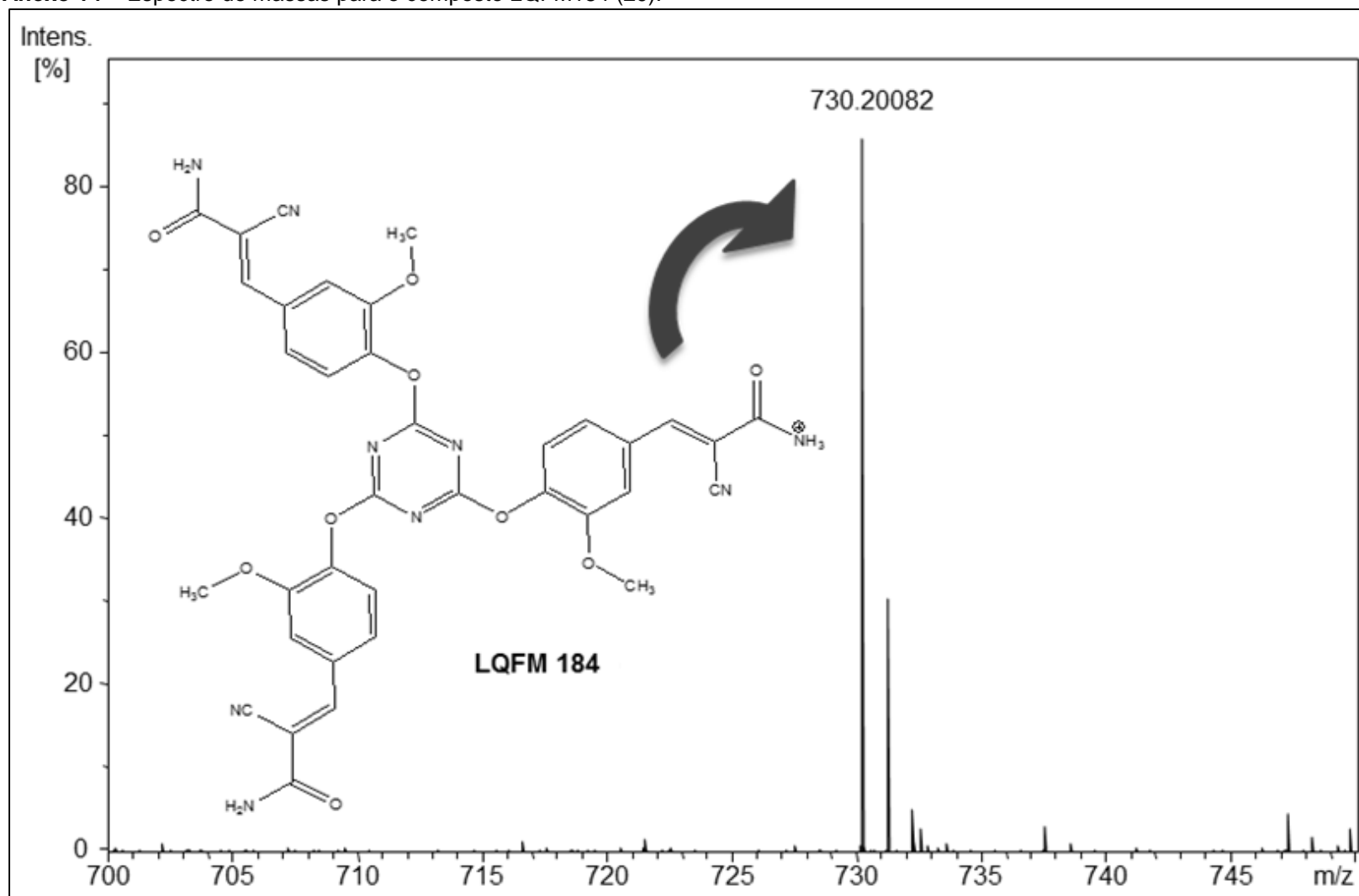
Anexo 12 – Espectro de massas para o composto 17.



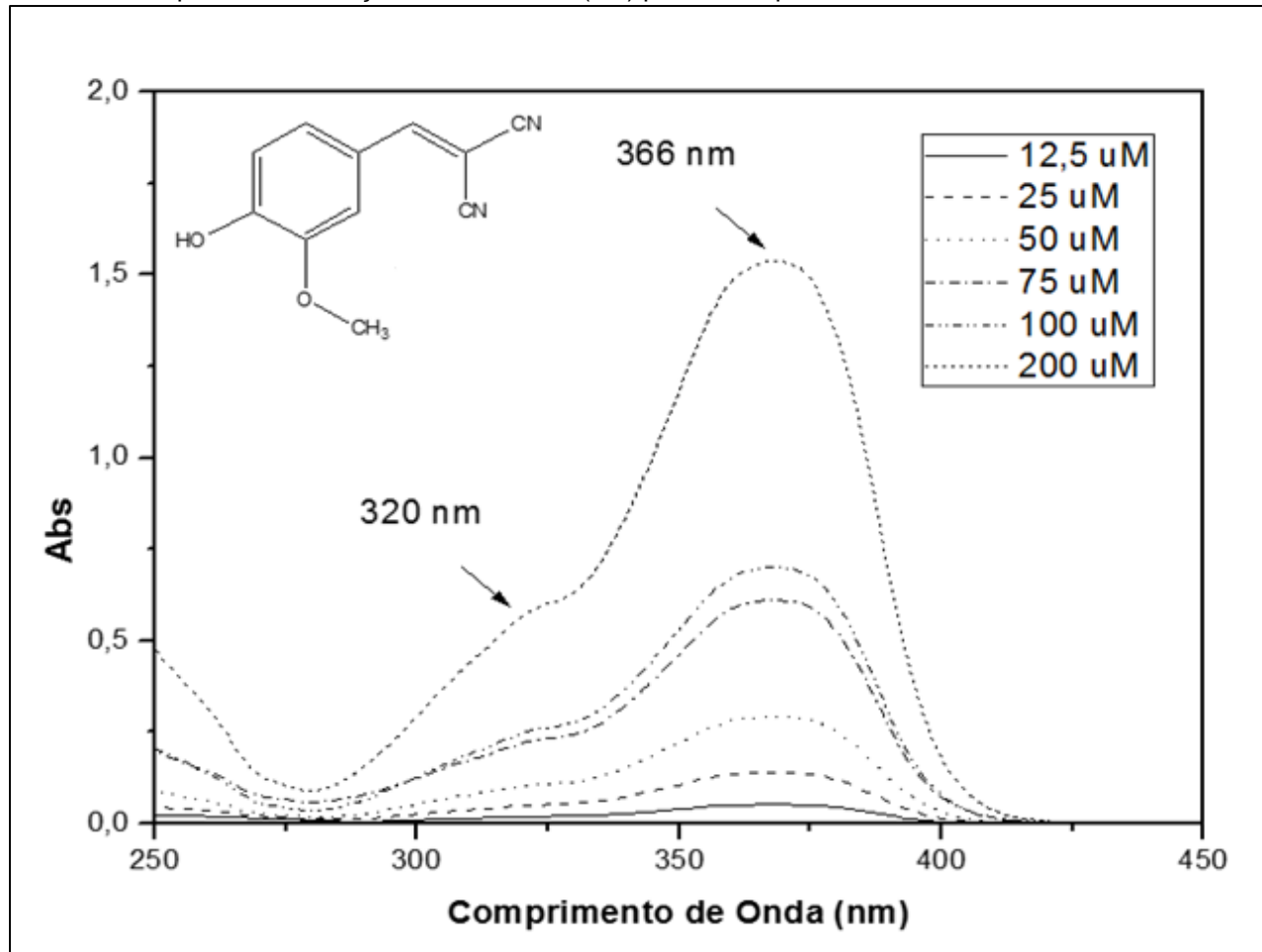
Anexo 13 – Espectro de massas para o composto 18.



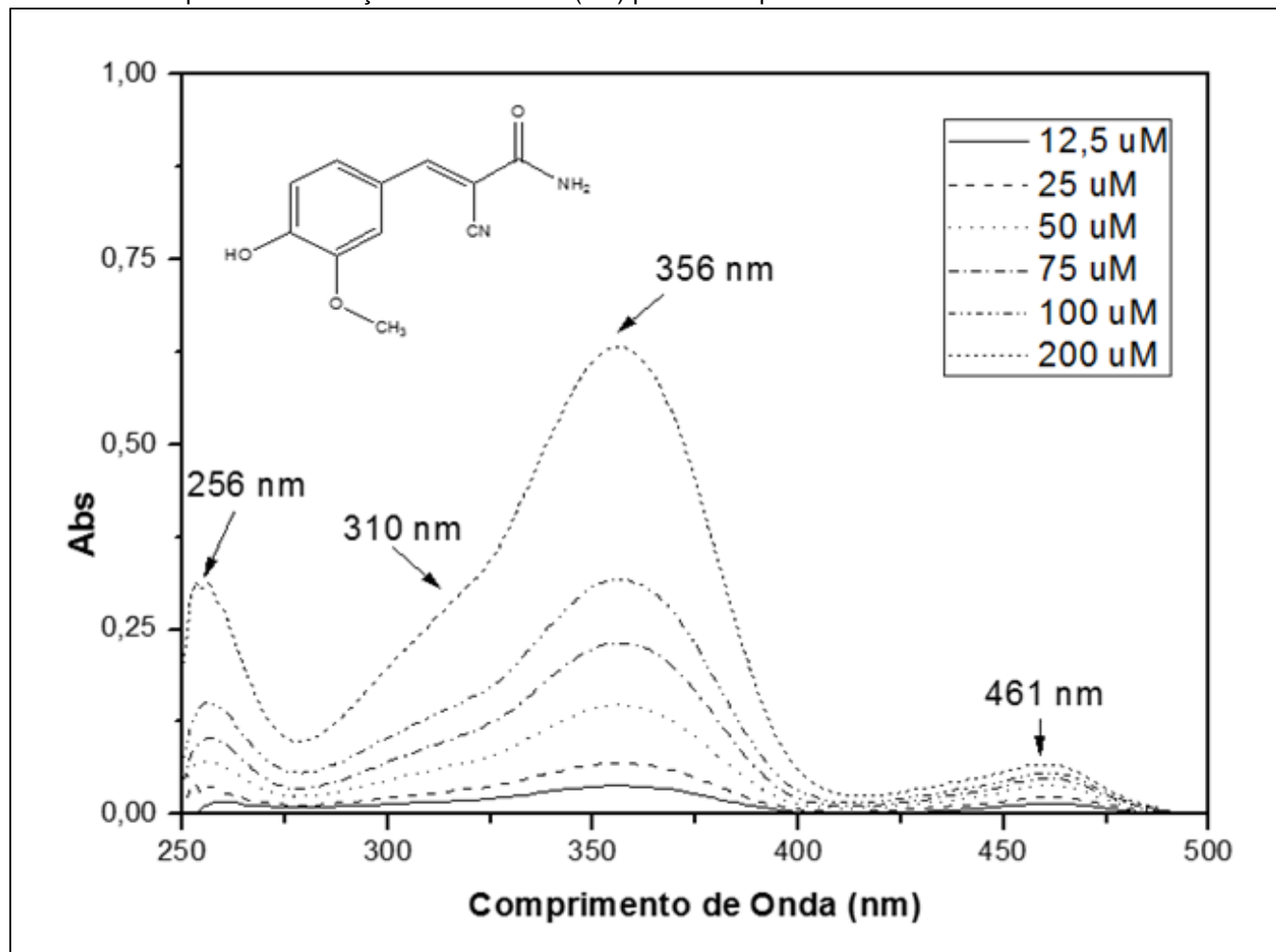
Anexo 14 – Espectro de massas para o composto LQFM184 (20).



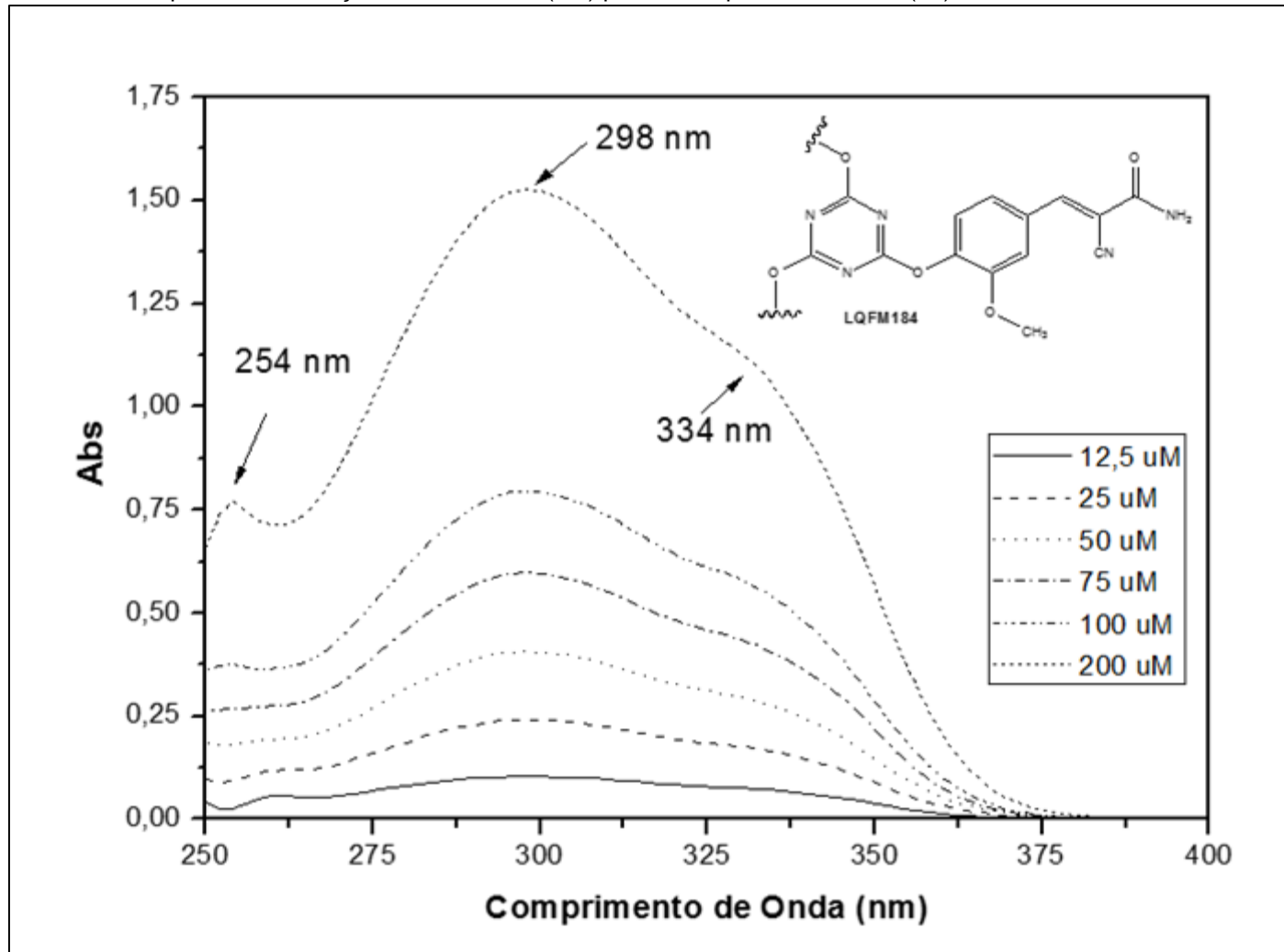
Anexo 15 – Espectro de absorção no ultravioleta (UV) para o composto 17.



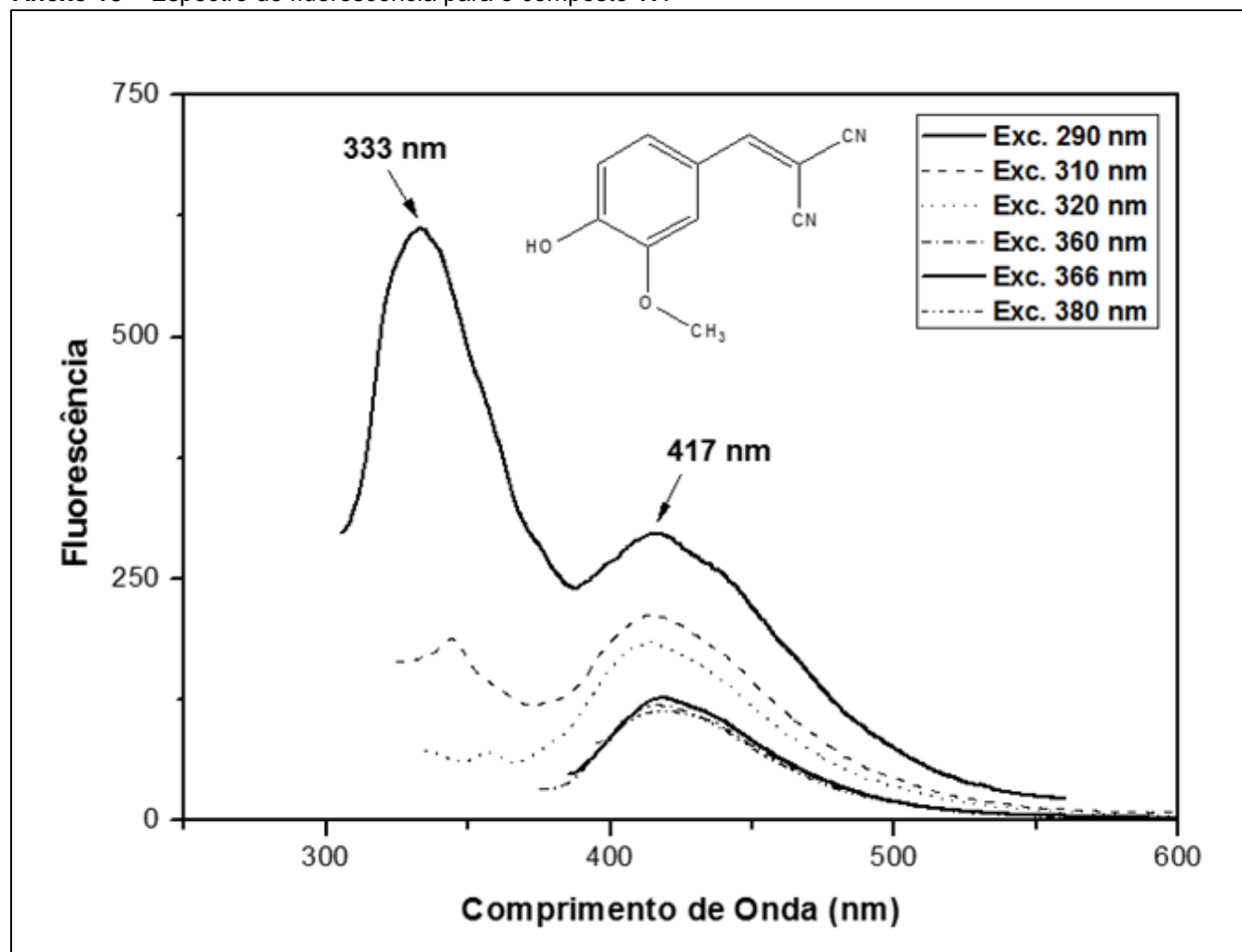
Anexo 16 – Espectro de absorção no ultravioleta (UV) para o composto 18.



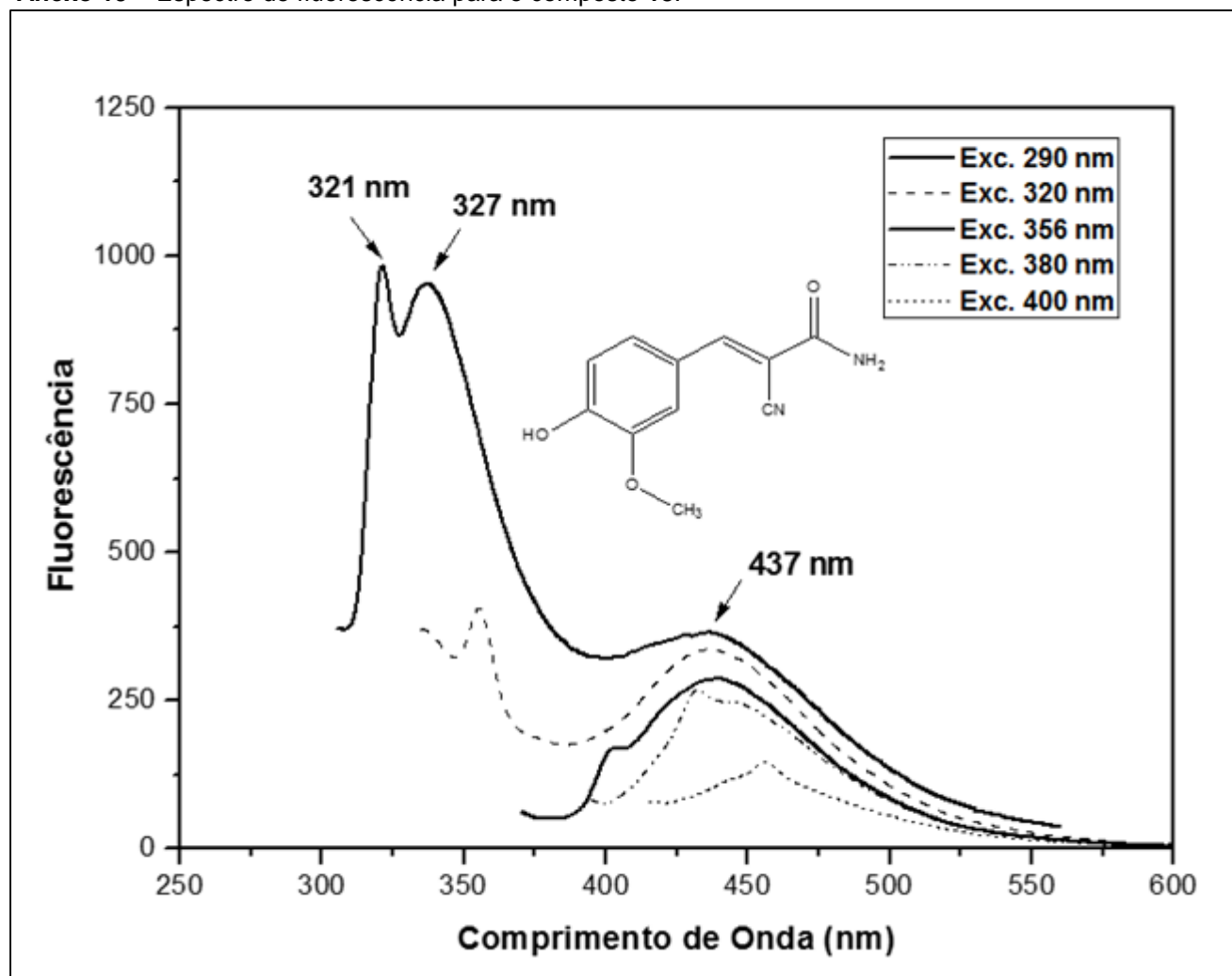
Anexo 17 – Espectro de absorção no ultravioleta (UV) para o composto LQFM184 (20).



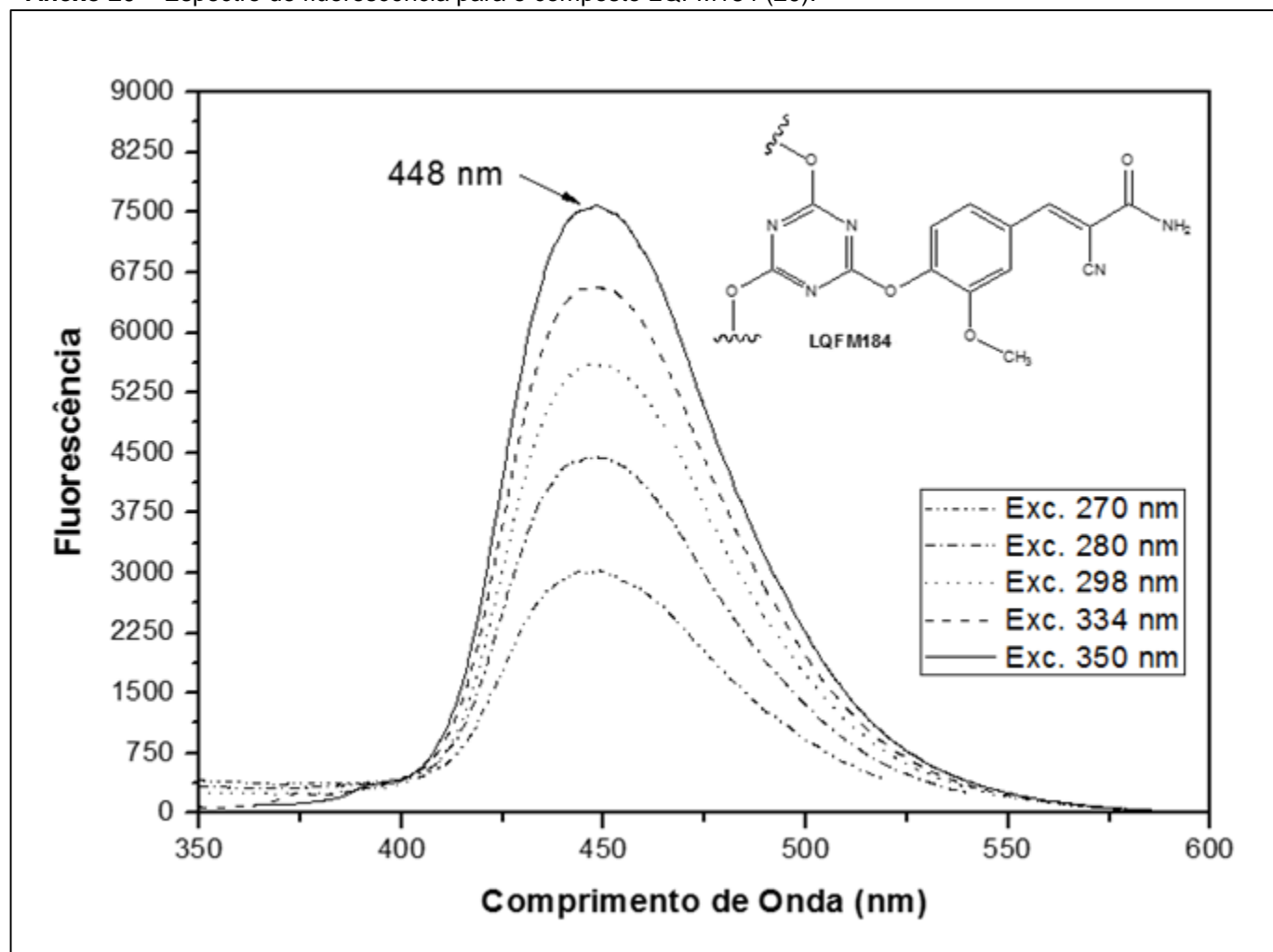
Anexo 18 – Espectro de fluorescência para o composto 17.



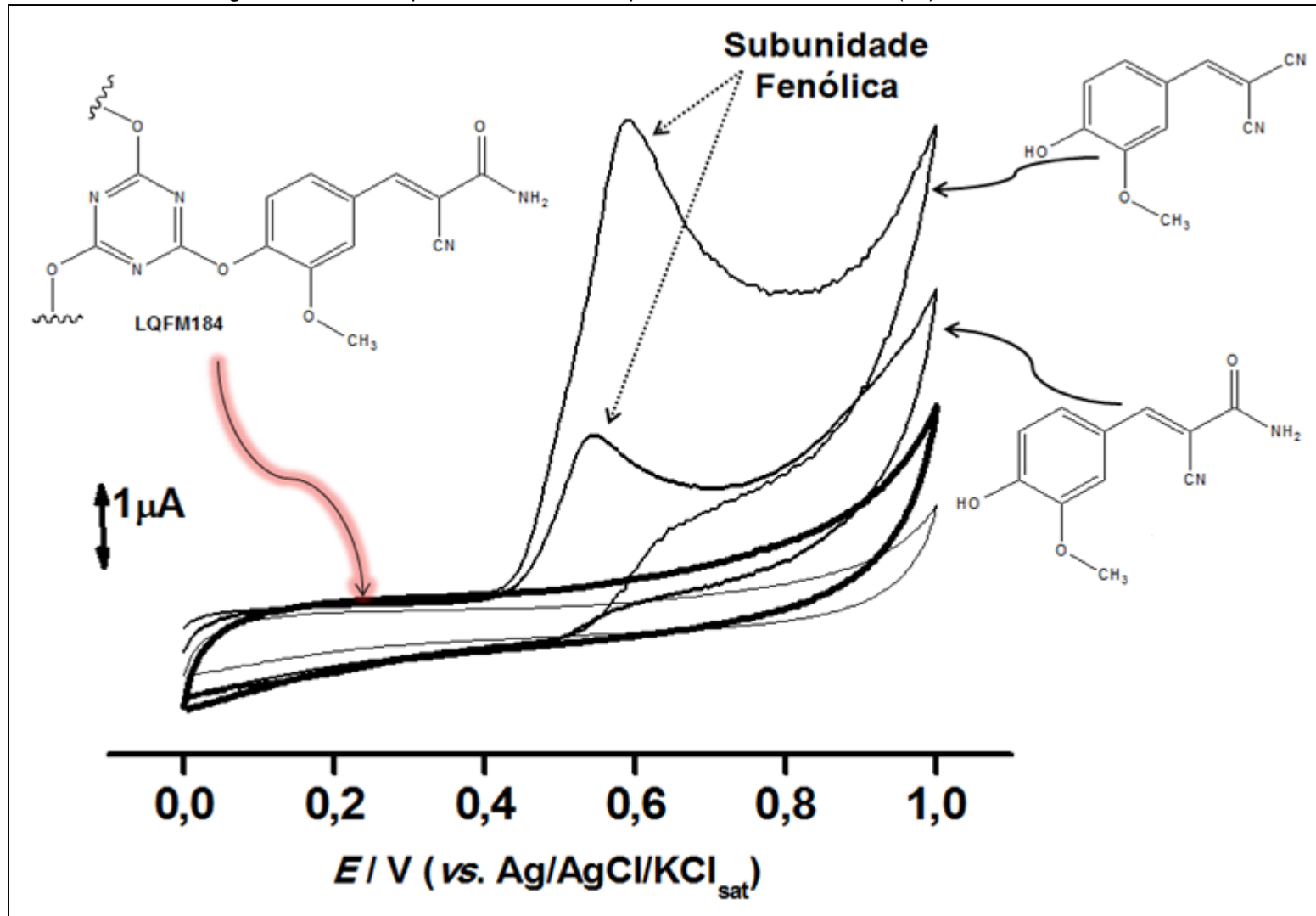
Anexo 19 – Espectro de fluorescência para o composto 18.



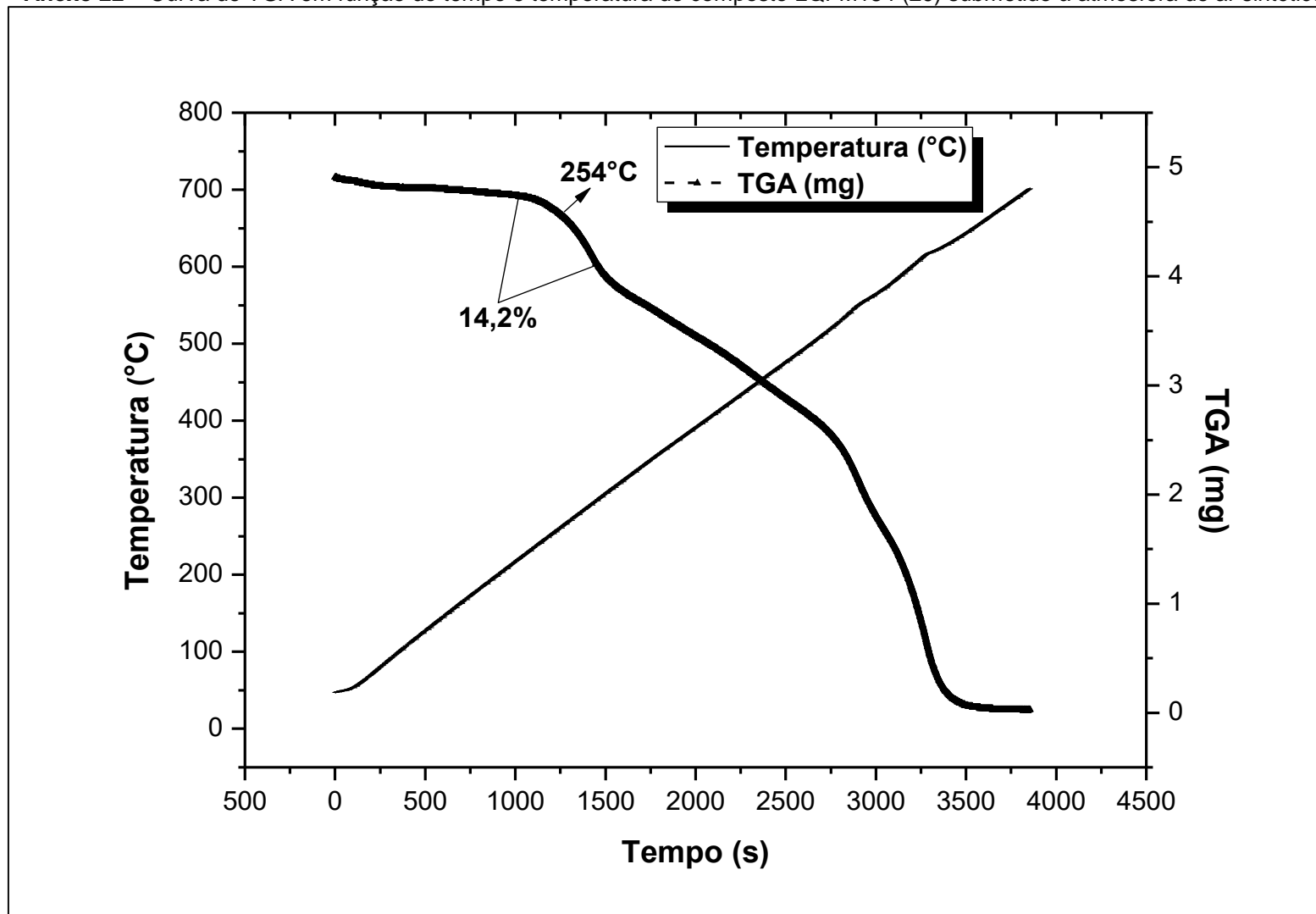
Anexo 20 – Espectro de fluorescência para o composto LQFM184 (20).



Anexo 21 – Voltamograma cíclico comparativo entre os compostos 17, 18 e LQFM184 (20).



Anexo 22 – Curva de TGA em função do tempo e temperatura do composto LQFM184 (20) submetido à atmosfera de ar sintético.



Anexo 23 – Espectro de absorção no ultravioleta para o *para*-metoxicinamato de octila (4).

