



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia



Síntese e Avaliação Fotoprotetora *in vitro* de Cromona e derivados incorporados à nanoemulsão

AMANDA DOS SANTOS ANTUNES

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

dezembro/2021

AMANDA DOS SANTOS ANTUNES

Síntese e Avaliação Fotoprotetora *in vitro*, de Cromona e derivados incorporados à nanoemulsão

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico generalista. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Martins Rabello dos Santos.

Amanda dos Santos Antunes

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

dezembro/2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A636s Antunes, Amanda dos Santos.

Síntese e avaliação fotoprotetora, in vitro, de cromona e derivados incorporados à nanoemulsão. [manuscrito] / Amanda dos Santos Antunes. - 2021.

45 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Martins Rebello.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Radiação Solar. 2. Fatores de proteção. 3. Nanoemulsão. 4. Cromonas. I. Martins Rebello, Viviane. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 687.552.2

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda dos Santos Antunes

Síntese e Avaliação Fotoprotetora in vitro de Cromona e derivados incorporados à nanoemulsão

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 16 de dezembro de 2021

Membros da banca

Doutorado- Viviane Martins Rebello dos Santos - Orientadora- Universidade Federal de Ouro Preto
Doutorado - Jason Guy Taylor - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutorado- André Luís Morais Ruela - Universidade Federal de Ouro Preto

Viviane Martins Rebello dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 16/12/2021



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Martins Rebello dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 07:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0260076** e o código CRC **C3714D65**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.013337/2021-15

SEI nº 0260076

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591707 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Acredito que, sem a força, sem os erros, sem os acertos e, principalmente, sem a dedicação que sempre tive, eu não teria chegado até aqui, por isso agradeço a mim por, apesar dos obstáculos, nunca desistir e nunca deixar de acreditar nos sonhos.

Ao meu pai, Rogelio Antunes de Campos, pelos cuidados, preocupações, amor, confiança depositada ao longo dos anos de estudo, por ser meu maior incentivador, por me auxiliar a passar por todas as adversidades que enfrentei ao longo dessa jornada.

A minha avó Marlene Angelina Antunes de Castro (in memoriam) pelo incentivo ao estudo por toda a minha infância e adolescência, e pelas conversas antes de dormir.

Ao meu irmão Guilherme dos Santos Antunes pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos de Ouro Preto, Amanda, Barbara, Iris, Mayra, Hyure, Suelen Dias, Lucas Resende, Wanessa Almeida, Sabrina, Vinicius, Tainá e Jaine, que comigo estiveram em minha trajetória de outro planeta.

Aos meus amigos de vida, Juliana, Gabriela, Isabella, Driele, Alessandra, Celso, Flávia, Lavinia e Valéria, por cada momento compartilhado nesses anos.

Ao meu amor, Fernanda Gava Bina, pelo carinho, cuidado, consolo nos meus momentos de adversidades e por toda a ajuda emocional nessa reta final.

À Prof^a Dra Viviane Martins Rabello por me orientar neste trabalho, pela paciência, por ter me inserido no universo científico que tanto me encanta e por ser muito mais do que uma orientadora, por ser uma amiga.

Ao Prof^o Dr. Jason Gay Taylor por todo o ensinamento e por toda a paciência durante a realização desse projeto.

À Escola de Farmácia (EFAR) e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pela inestimável formação profissional e pessoal.

Aos amigos, o meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam um abdicação”.

Simone de Beauvoir.

RESUMO

As cromonas são compostos presentes na natureza, que apresentam diversos efeitos farmacológicos. Ela possui uma estrutura aromática capaz de ser absorvida pela radiação UV, dessa forma se tornando um filtro solar com grande potencial. Diante de varios estudos publicados, podemos observar uma influencia negativa do composto Oxibenzona no organismo de adolescentes do sexo maculino e o deposito desse composto nos recifes ocasionando destruição dos mesmos. Neste trabalho, sintetizamos compostos capazes de sutituir do composto oxibenzona nos protetores solares. Os compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c) foram sintetizadas e suas ações fotoprotetoras foram avaliadas. Os compostos foram preparadas de acordo com procedimentos da literatura e caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. A proteção solar *in vitro* (FPS) foi determinado pelo método Mansur e a citotoxicidade foi avaliada usando o fator ensaio de sulforodamina B. A 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a) e o derivado 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) demonstraram valores de FPS altos e não apresentaram citotoxicidades em relação aos fibroblastos humanos MRC-5 nas concentrações testadas, indicando um grande potencial para futuros ensaios *in vivo* e ensaios clínicos. Finalmente, os compostos foram incorporados a uma nanoemulsão. As nanoemulsões mostraram grande homogeneidade no tamanho das gotas e excelente estabilidade. O composto com substituintes de metoxila (3b) foi considerada como mais promissor, devido propriedades fotoprotetoras ideais desejáveis para utilização e incorporação em formulações de protetores solares.

Palavras-chave: cromona, filtros UV orgânicos, citotoxicidade, nanoemulsão

ABSTRACT

Chromones are compounds present in nature, which have several pharmacological effects. It has an aromatic structure capable of being absorbed by UV radiation, thus becoming a sunscreen with great potential. In the face of several published studies, we can observe a negative influence of the compound Oxybenzone in the organism of male adolescents and the deposition of this compound on reefs, causing their destruction. In this work, we synthesized compounds capable of replacing the oxybenzone compound in sunscreens. The compounds 3-Benzoyl-2-methyl-4H-chroman-4-one (3a), 3-(3,4-Dimethoxybenzoyl)-2-methyl-4H-chromon-4-one (3b) and 2-Methyl-3-(4-nitrobenzoyl)-4H-chromon-4-one (3c) were synthesized and their photoprotective actions were evaluated. The compounds were prepared according to literature procedures and characterized by high-resolution mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. In vitro sun protection (SPF) was determined by the Mansur method and cytotoxicity was evaluated using the sulforodamine B factor assay. The 3-Benzoyl-2-methyl-4H-chroman-4-one (3a) and the 3-(3,4-Dimethoxybenzoyl)-2-methyl-4H-chromon-4-one derivative (3b) demonstrated high SPF values and showed no cytotoxicity towards MRC-5 human fibroblasts at the tested concentrations, indicating great potential for future in vivo and clinical trials. Finally, the compounds were incorporated into a nanoemulsion. The nanoemulsions showed great homogeneity in droplet size and excellent stability. The compound with methoxyl substituents (3b) was found to be most promising, due to ideal photoprotective properties desirable for use and incorporation into sunscreen formulations.

Keywords: chromone, organic UV filters, cytotoxicity, nanoemulsion

Sumário

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1 Introdução.....	1
2 Referencial Teórico	2
2.1 Radiação Ultravioleta	2
2.2 Protetores Solares Sintéticos.....	4
2.2.1. <i>Protetores Solares e Benzofenonas</i>	7
2.3 Cromonas.....	8
2.4 Nanoemulsão	9
3 Justificativa.....	10
4 Objetivos	11
4.1 Objetivo Geral	11
4.2 Objetivos Específicos	11
5 Material e métodos	12
5.1 Considerações Gerais.....	12
5.1.1 <i>Procedimento geral para a síntese de ésteres 1a-c</i>	13
5.1.2 <i>Procedimento geral para a síntese de dicetonas 2a-c</i>	13
5.1.3 <i>Procedimento geral para a síntese de cromonas 3a-3c</i>	13
5.2. Determinação da absorvância dos compostos 3a-c	14
5.3. Determinação in vitro do Fator de Proteção Solar (FPS) composto 3a-c.....	15
5.4. Ensaio de Fotoestabilidade	15
5.5. Ensaio de Citotoxicidade	16
5.6. Preparação de Nanoemulsões	16
5.7. Coeficiente do Log P	17
6 Resultados e discussão	17
6.1 Síntese da cromona e derivados.....	17
6.2 Fator de Proteção Solar (FPS)	19
6.3. Avaliação da Fotoestabilidade.....	21
6.4. Citotoxicidade.....	23

6.5. Nanoemulsão	23
7. Conclusão	26
8 Anexos.....	27
9 Referências	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Radiação solar atingindo camadas da pele.....	04
Figura 2: Características do melanoma e não melanoma.....	06
Figura 3: Corais embranquecidos pelos protetores solares com Benzofenona 3.	08
Figura 4: Estrutura da Cumarina e da Cromona	09
Figura 5: Síntese de derivados de cromona: 1 a- 1 c piridina, temperatura ambiente, 15 min; 2 ^a -2c piridina, KOH, 50 ° C, 15 min; 3 ^a -3c NaOAc/Ac2O, 140 °C, 1 hora	14
Figura 6: Estruturas dos compostos Sintetizados (3a-3c)	18
Figura 7: Espectro UV-Vis da solução dos compostos 3a-3c	20
Figura 8: Fotoestabilidade do composto 3a (Cromona).....	22
Figura 9: Fotoestabilidade do composto 3b (3Aroilcromona)	22
Figura 10: Fotoestabilidade do composto 3c (3-Nitrocromona).....	22
Figura 11: Citotoxicidade dos composto 3a- 3c e benzofenona.....	23
Figura 12: Nanoemulsões 24 horas após a preparação: (a) composto 3 ^a ; (b) composto 3b; (c) padrão 2: benzofenona-3 e (d) padrão 1: Neo Heliopan®	24
Figura 13: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do compost 3a	27
Figura 14: Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do compost 3a.....	28
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do compost 3b.....	28
Figura 16: Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do compost 3b.....	29
Figura 17: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do compost 3c.....	29
Figura 18: Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do compost 3c.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: EE e I constantes para o cálculo do FPS <i>in vitro</i> .	5
Tabela 2: Composição em porcentagem para a preparação da nanoemulsão com as cromonas 3 ^a e 3b e os padrões	17
Tabela 3: FPS dos compostos 3a, 3b e 3c dos padrões utilizados	21
Tabela 4: Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanoemulsões com composto 3 ^a , composto 3b e padrões	25
Tabela 5: FPS das nanoemulsões de compostos e Padrões	26

LISTA DE ABREVIATURAS

UV	Ultravioleta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FPS	Fator de Proteção Solar
DP	Desvio Padrão
FDA	Food and Drug Administration
DEM	Dose Eritematosa
EE	Efeito Eritemogénico
I	Intensidade do Sol
ABS	Absorção da Amostra
INCA	Instituto Nacional do Câncer
A/O	Água em Óleo
O/A	Óleo em Água
3a	Cromona
3b	3-Aroilcromona
3c	3-Nitrocromona
P1	Padrão 1 Neo Heliopan®
P2	Padrão 2 Benzofenona 3
EPI	Inversão de fase de Emulsão
RMN	Ressonancia Magnetica Nuclear
IV	Infravermelho

1 Introdução

No mundo, muito tem se falado sobre câncer, e um dos mais frequentes é o câncer de pele. No Brasil, ele corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2017). Um dos fatores mais frequentes para tal ocorrido é a presença da radiação ultravioleta (UV) através dos raios solares. A radiação UV corresponde a faixa de 200nm a 400nm, abrangendo as radiações UVA (320-400nm), UVB (290-320) e UVC (200-290nm), sendo a radiação UVC completamente absorvida pela camada de ozônio e não atinge a Terra (GONÇALVES et al, 2018).

Uma das formas preventivas do câncer de pele é o uso de roupas apropriadas para a luz UV e principalmente o uso frequente do protetor solar. Mesmo dessa forma, o uso tópico de formulações protetoras é um complemento essencial para a prevenção de futuras patologias na pele. A ação fotoprotetora de um filtro solar é medida universalmente através do fator de proteção solar (FPS) (GONÇALVES et al, 2018). Este fator estabelece o aumento do tempo à exposição solar com o produto fotoprotetor aplicado sem a ocorrência de eritema, ou seja, quanto maior o FPS maior será o tempo permitido para uma exposição segura. O FPS é aplicado exclusivamente às radiações UVB, pois estas são as causadoras de eritemas (ERGINDEMIR et al, 2016). Em grande maioria dos protetores solares comerciais, o FPS é exclusivamente às adiações UVB, uma vez que são as de maior profundidade na pele ocasionando assim melanomas.

Na indústria de cosméticos um dos produtos mais frequentemente usado em protetores solares é o composto 3-benzofenona, conhecido também como Oxibenzona. Estudos vem demonstrando que a Oxibenzona, presente em grande maioria de filtros solares e cosméticos, é um contaminante humano e ambiental. Aproximadamente 97% das pessoas testadas, apresentaram o composto oxibenzona em sua urina, além de recifes de corais estarem embranquecendo em cursos de águas e peixes (DINARDO, 2017). Desta forma, indústrias estão desenvolvendo novos protetores solares, que não prejudiquem tanto a saúde humana e o meio ambiente, através de compostos naturais ou sintéticos como a classe das flavonas e cromonas.

As cromonas são compostos presentes na natureza, que apresentam diversos efeitos farmacológicos. Ela possui uma estrutura aromática capaz de ser absorvida pela radiação UV, dessa forma se tornando um ótimo filtro solar. Em estudos, a cromona é descrita como anti-

inflamatório e antialérgica inibindo a degranulação de mastócitos em resposta a vários estímulos (REV. Medical, 2018). Além de atuar nessas classes, a cromona também pode atuar como agentes antibacterianos, anticâncer e antioxidantes e por apresentar uma estrutura aromática, ela é capaz de absorver na região do UV facilitando assim o uso em protetores solares. A cromona tem sido considerada uma classe com estrutura privilegiada para desenvolvimento de novas drogas e novos estudos (GUOBI Chai et al, 2018).

A indústria de cosméticos farmacêuticos vem crescendo nos últimos anos devido a grande conscientização por produtos que promovem uma boa relação com a pele e diminuem as patologias causadas pela radiação UV (ROYER et al, 2013). Há um grande aumento pela procura de nanoemulsões cosméticas para o cuidado da pele, uma vez que tais produtos tem uma aplicação controlada e uma dispersão otimizada nas camadas da pele (SINGH et al, 2009). As nanoemulsões podem ser classificadas em relação a sua morfologia. São dispersões finas de óleo em água, ou vice versa, com gotículas cobrindo a faixa de tamanho de 100-600 nm. Algumas das vantagens, é que ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões podem ser preparadas em concentrações menores entre 3 a 10 % de surfactante pode ser o suficiente. A utilização de nanoemulsões em filtros solares promove uma maior efetividade da proteção solar, tendo como vantagens a melhor penetração da pele, homogênea distribuição, liberação de ativos em camadas mais profundas e um aumento da estabilidade físico químico (BACARDIT et al, 2020). A utilização de novos produtos incorporados a nanoemulsões tem sido grandes alvos de estudos, principalmente quando relacionados a fotoproteção de novos produtos. A cromona 3a e 3b se torna um excelente composto para a incorporação em uma nanoemulsão e assim torna-se um potencial protetor solar uma vez que a sua estrutura é aromática e dessa forma absorve no comprimento de onda do UV-Vis.

2 Referencial Teórico

2.1 Radiação Ultravioleta

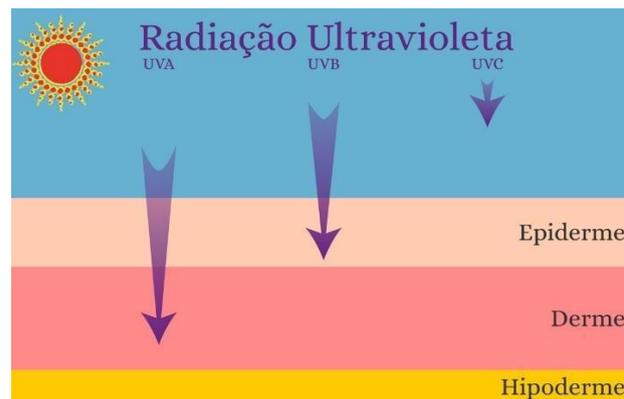
O espectro eletromagnético da radiação solar pode ser dividido em duas regiões: ionizante e não ionizante (POLONINI, 2014). Onde a radiação ionizante é dividida em raios gamas e raios X, e a radiação não ionizante compreende a faixa do ultravioleta (UV), luz visível e a infravermelha (ERGINDEMIR et al, 2016).

A radiação ultravioleta é menos incidente na superfície terrestre, apenas 5% é irradiada, pois é absorvida pelo oxigênio e pela camada de ozônio na estratosfera (MATHEUS et al, 2002). Contudo, as ondas eletromagnéticas de menores comprimentos de onda (λ) são as mais energéticas, portanto, a radiação UV é a que possui maior impacto sobre a saúde humana (ARAUJO 2008). Todavia, a radiação UV ainda possui subdivisões em função de diferentes comprimentos de ondas.

As radiações UVA (320-400nm) são menos energéticas que a radiação UVB e penetram na pele atingindo a derme (NARENDHIRAKANNAN, 2013). São raios responsáveis pelo envelhecimento precoce cutâneo e por processos oxidativos da pele, causando estresse oxidativo ao tecido, uma vez que a pele é produzida por radicais livres oxidativos, dessa forma ocasiona diversos efeitos adversos sobre o colágeno da pele (tecido mais sensível à radiação UVA) (MATHEUS et al, 2002). Já a radiação UVB (290-320) tem a capacidade de atravessar a atmosfera e dessa forma atinge toda a superfície terrestre. Apresentam um menor comprimento de onda em consequência tem um menor poder de penetração na pele sendo absorvida pela epiderme (POLONINI et al, 2014). Uma frequente exposição à radiação UVB pode causar danos a pele assim como a radiação UVA, porém a radiação UVB promove a formação de espécies reativas de oxigênio, aumentando assim o estresse oxidativo na pele (ARAUJO, 2008). Além disso, por possuir uma alta energia, acaba formando lesões no DNA como formação de dímeros de pirimidina, inflamação e câncer de pele (CABRAL et al, 2013).

A radiação UVC, de maior energia e conseqüentemente a mais danosa biologicamente, é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e assim seu papel nas patologias humanas causadas pela exposição à radiação solar é mínimo. Já as radiações UVB e em menor extensão UVA, são fatores causadores de diversas desordens, incluindo câncer de pele (VICENTINI, 2009).

Figura 1: Radiação solar atingindo camadas da pele.



Fonte: Dermatologia e Saúde, 2019

2.2 Protetores Solares Sintéticos

Os filtros solares são substâncias capazes de absorver a energia eletromagnética no infravermelho. Dessa forma a radiação UV não é capaz de atingir a pele, pois formará uma película sob a pele evitando que a radiação ultrapasse a barreira e penetre na epiderme e derme, assim evitando danos sobre a mesma (RIBEIRO, R et al, 2004). Hoje, no mercado existem duas classes de protetores solares: orgânicos e inorgânicos que podem ser classificados como filtros de efeito químico e filtros de efeito físico, respectivamente. Os filtros orgânicos são descritos como moléculas orgânicas que têm a função de absorver a radiação UV e transformá-la em radiações com energias menores e que são inofensivas para os humanos (SCHUELLER et al, 2000). Já os filtros solares inorgânicos são representados por dois tipos de óxidos, e por esse motivo apresentam a forma mais segura e eficaz para proteger a pele da exposição a luz solar, uma vez que não existe um alto potencial de irritação por esses compostos, além disso são filtros recomendados na formulação de protetores solares infantis, uma vez que a pele de crianças são mais sensíveis que a pele de adultos (SCHUELLER et al, 2000).

A ação fotoprotetora de um filtro solar é medida universalmente através do fator de proteção solar (FPS) (MATHEUS et al, 2002). Este fator estabelece o aumento do tempo à exposição solar com o produto fotoprotetor aplicado sem a ocorrência de eritema, ou seja, quanto maior o FPS maior será o tempo permitido para uma exposição segura. O FPS é aplicado exclusivamente às radiações UVB, pois estas são as causadoras de eritemas (ARAÚJO, 2008).

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), o protetor solar pode ser definido como sendo uma razão numérica entre a Dose Eritematosa Mínima (DEM), na qual a pele é protegida pelo fotoprotetor, e a Dose Eritematosa Mínima onde a pele não é protegida (SCHALKA et al, 2011).

O valor de FPS é determinado de acordo com o tempo de exposição da pele a radiação UV necessário para produzir patologias na pele quando protegida pelo protetor solar, assim para o mesmo efeito com a pele sem a proteção de um filtro solar (RIBEIRO et al, 2004).

Os testes para a determinação do FPS podem ser realizados por métodos in vitro ou in vivo. Segundo a RDC nº 237/02 de 22 de agosto de 2002, no Brasil é recomendado que os testes sejam realizados pelo método in vivo, quando é necessário a presença de voluntários sadios, sob diferentes tonalidades de pele. Porém, vários métodos in vitro foram desenvolvidos com o intuito de evitar reações adversas nos voluntários e foram baseados nas propriedades refletoras dos filtros apresentando fácil metodologia e rapidez na obtenção dos resultados (PINHO et al, 2014).

Um dos métodos in vitro mais utilizados é o método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur e colaboradores. Ele permite a determinação do FPS através da equação matemática 2, onde apresenta uma boa correlação com resultados obtidos (MANSUR et al, 1986).

$$SPF = FC \sum_{290}^{320} \frac{EE(\lambda)I(\lambda).Abs(\lambda)}{290}$$

Equação 1: Onde FC = 10 (constante), EE = efeito eritemogénico, I = Intensidade do sol e Abs = absorção da amostra. As leituras de absorção foram realizadas na faixa de 290 a 320 nm com intervalos de 5 nm e adicionadas na **Equação 1**. As constantes EE e I foram pré-definidas por Mansur (TAB. 1).

Tabela 1: EE e I constantes para o cálculo do FPS in vitro.

λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
EE (λ) x 0.0150	0.08170	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180	
Σ	1.0000						

Legenda: EE (λ) = efeito eritemogénico da radiação do comprimento de onda, I (λ) = intensidade solar no comprimento de onda (λ), λ = comprimento de onda. (MANSUR et al, 1986)

O Brasil é o país onde o câncer de pele é mais frequente, correspondendo 30% de todos os tumores malignos registrados, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). São classificados em dois tipos: melanoma e não melanoma, sendo o tipo não melanoma o mais grave uma vez que há grande possibilidade de metástase (FIG. 2). O tipo não melanoma é mais comum em adultos de 40 anos e um câncer raro em crianças e negros, sendo as pessoas com pele clara as mais atingidas por essa patologia (INCA, 2017).

Figura 2: Características do melanoma e não melanoma.



FONTE: A. C. CAMARGO CANCER CENTER, 2020

A fotoproteção é um fator terapêutico e profilático frente aos danos causados pela radiação UV. A prevenção diária muitas vezes é intencional, como o uso de roupas apropriadas. Mesmo dessa maneira, o uso tópico de formulações protetoras é um complemento essencial para a prevenção de futuras patologias na pele. Em grande maioria dos protetores solares comerciais, o FPS é exclusivamente às radiações UVB, uma vez que são as de maior profundidade na pele ocasionando assim melanomas.

2.2.1. Protetores Solares e Benzofenonas

As benzofenonas mais conhecidas como oxibenzonas são hidrocarbonetos aromáticos que fornecem boa fotoproteção UVB-UVA (284-340nm). Por apresentar um sistema aromático, as benzofenonas absorvem na região do UV e assim, foi um dos primeiros compostos a serem utilizados em filtro solares. (NASCIMENTO et al, 2014)

A benzofenona, faz parte de uma classe de compostos que age tanto na via de absorção quanto na função de refletir os raios UV pela radiação solar (NASCIMENTO et al, 2014). Existe, portanto, protetores solares orgânicos comerciais que apresentam estruturas de alto peso molecular, que apresentam em sua formulação um amplo espectro de fotoproteção e fazem cumprir com os pré requisitos para um ideal protetor solar orgânico UV (SHAATH, 2007) . Dentre esses compostos que apresentam a 3-benzofenona em sua composição podemos citar o Mexoryl XL® e Mexoryl SX® da marca L'oreal, Neo Heliopan AP® da marca Symrise (SHAATH, 2007).

Os protetores solares comerciais utilizam muito o produto 3-benzofenona. Em estudos recentes realizados no Havaí, foi possível observar a influência negativa deste composto em adolescentes do sexo masculino, atingindo o sistema endócrino e causando efeitos adversos nos mesmos e pela substancia ser absorvida pela pele, já que nessa região há um grande uso deste cosméticos devido as altas temperaturas (SINGH et al, 2009). Aproximadamente, 97% das pessoas testadas apresentaram o composto oxibenzona em sua urina, uma vez que este composto tem uma grande absorção pela pele depositando assim no tecido. Estudos observaram que há a possibilidade de melanomas pela ação dos núcleos benzênicos de alguns protetores orgânicos comerciais (NASCIMENTO et al, 2014). Além de causar problemas no organismo, a 3-benzofenona causa a destruição de corais nos recifes, estes vêm apresentando ao longo do tempo, embranquecimento e conseqüentemente morrendo em decorrência da grande proporção de filtro solar com o produto 3-benzofenona nos mares e acabam se depositando nos recifes (**FIG. 3**) (ERGINDEMIR et al, 2016).

Figura 3: Corais embranquecidos e destruídos pelos protetores solares com Benzofenona 3.



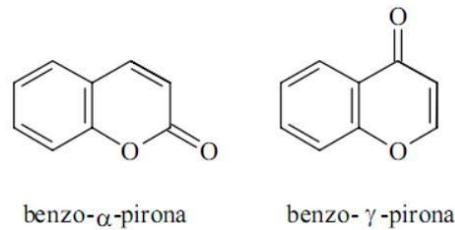
Fonte: Organic News Brasil, 2015

Diante de tais problemas, cientista e empresas de cosméticos vêm pesquisando diferentes produtos com interação UV para serem incorporadas em protetores solares comerciais. Esses filtros solares podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os filtros orgânicos são capazes de absorver os raios UV e os convertem em infravermelho, dessa forma reduzindo os efeitos dos raios solares UV. Já os filtros inorgânicos são, na sua grande maioria, óxidos metálicos e oferecem proteção pelo reflexo da radiação incidente da luz solar. Estudos recentes vêm demonstrando um grande interesse para compostos naturais e sintéticos a partir de produtos encontrados na natureza (GONÇALVES et al, 2018).

2.3 Cromonas

A classe cromona está presente na natureza, principalmente em plantas e é pertencente à família dos homoisoflavonoides. São compostos heterocíclicos oxigenados formados por um anel benzênico fundido a um anel 4-pirona, com estrutura química isomérica as cumarinas. O sistema de anéis da cromona é o grupamento base de vários flavonóides, como flavonas e isoflavonas (GUOBI CHAI et al, 2018). Em razão da sua atividade biológica e farmacológica, as cromonas têm sido um alvo de grande interesse sintético.

Figura 4: Estrutura da Cumarina e da Cromona.



Fonte: Adamo Porto Gomes, 2017

As classes das cromonas fazem parte da classe farmacológica de anti-inflamatórios. Foram feitos diversos testes ao longo dos anos, com o intuito de encontrar um medicamento de ação imediata sobre os sintomas da asma brônquica. Em 1967, Roger Altounyan, um pesquisador que também sofria de asma brônquica, foi quem descobriu através de testes clínicos, o efeito inibidor da cromona sobre asma brônquica. Em estudos, a cromona é descrita como anti-inflamatório e antialérgica inibindo a degranulação de mastócitos em resposta a vários estímulos (FILHO, 2018).

Além de atuar nessas classes, a cromona também pode atuar como agentes antibacterianos, anticâncer e antioxidantes e por apresentar uma estrutura aromática, ela é capaz de absorver na região do UV facilitando assim o uso em protetores solares. A cromona tem sido considerada uma classe com estrutura que possa vir levar um desenvolvimento de novas drogas e novos estudos (GUOBI CHAI et al, 2018).

2.4 Nanoemulsão

Emulsão é definida pela mistura de dois ou mais líquidos imiscíveis. Emulsões Água/Óleo (A/O), Óleo/Água (O/A), ou emulsões duplas (A/O/A) são muito utilizadas no ramo da farmacologia para aplicações parenteral. Elas são instáveis termodinamicamente, dessa forma alguns surfactantes são necessários para estabilizar as gotículas da emulsão (JENJOB, 2019). Já as nanoemulsões podem ser classificadas em relação a sua morfologia. São dispersões finas de óleo em água, ou vice versa, com gotículas cobrindo a faixa de tamanho de 100-600 nm (BACARDIT et al, 2020). A emulsão tem a água como fase contínua e óleo como fase dispersa, já a nanoemulsão produz uma emulsão à base de óleo ou água em

óleo. As nanoemulsões são termodinamicamente estáveis, possuem aparência leitosa e apresentam muitas vantagens para aplicação em cuidados pessoais e cosméticos (MATHEUS et al, 2002). Algumas das vantagens, é que ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões podem ser preparadas em concentrações menores entre 3 a 10 % de surfactante pode ser o suficiente. Devido ao seu pequeno tamanho, elas podem penetrar através da superfície “áspera” da pele e isso melhora a penetração de ativos (ARAUJO et al, 2008).

A indústria de cosméticos farmacêuticos vem crescendo nos últimos anos devido à grande conscientização por produtos que promovem uma boa relação com a pele e diminuem as patologias causadas pela radiação UV (ROYER et al, 2013). As aplicações dos cosméticos vêm se estendendo a proteção da pele, clareamento, bronzamento e produtos de antienvelhecimento, além disso, existem formulações para desodorantes, cremes corporais e faciais. Há um grande aumento pela procura de nanoemulsões cosméticas para o cuidado da pele, uma vez que tais produtos tem uma aplicação controlada e uma dispersão otimizada nas camadas da pele (SINGH et al, 2009).

As utilizações de nanoemulsões em filtros solares promovem uma maior efetividade da proteção solar, tendo como vantagens a melhor penetração da pele, homogênea distribuição, liberação de ativos em camadas mais profundas e um aumento da estabilidade físico químico (NARENDHERAKANNAN et al, 2013). A utilização de novos produtos incorporados a nanoemulsões tem sido grandes alvos de estudos, principalmente quando relacionados a fotoproteção de novos produtos.

3 Justificativa

Diversos estudos clínicos demonstraram uma crescente contaminação por oxibenzona presente nos filtros solares, dentre esses se observou uma toxicidade no sistema endócrino de adolescentes do sexo masculino e alterações nas células mamárias de mulheres evoluindo assim para o futuro câncer (SINGH et al, 2009). Além da grande presença da substancia oxibenzona presente nos corais de áreas de banho, assim ocasionando seu embranquecimento e conseqüentemente em sua morte (ERGINDEMIR et al, 2016). Com base nesses fatos torna-se necessário a busca de um protetor solar que não seja tóxico para o organismo humano, que não prejudique o ambiente e que apresente um caráter fotoprotetor. A cromona é uma substancia natural que pode ser sintetizada, com estrutura aromática capaz de absorver na

região do ultravioleta, podendo também atuar nas classes, farmacológicas de antibacterianos, anticâncer e antioxidantes. A cromona tem sido considerada uma classe com estrutura nova, encontrada amplamente na natureza com com propriedades não tóxicas para a pele e tão pouco para o meio ambiente, dessa forma é uma estrutura ideal para desenvolvimento de novas drogas e novos estudos (GUOBI CHAI et al, 2018).

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Sintetizar e Avaliar a atividade fotoprotetora *in vitro* da cromona e derivados.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1. Sintetizar os compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c);

4.2.2. Caracterizar os compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c);

4.2.3. Determinar a fotoproteção (FPS) dos compostos compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c);

4.2.4. Verificar a Fotoestabilidade dos compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c);

4.2.5. Avaliar a citotoxicidade dos compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-croman-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b);

4.2.6. Preparar a base de Nanoemulsão;

4.2.7. Determinar a atividade de fotoproteção da nanoemulsão com os compostos 3-Benzoil-2-metil-4H-cromon-4-ona (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b).

5 Material e métodos

5.1 Considerações Gerais

Reagentes e solventes (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram utilizados sem purificação adicional e foram comprados de fornecedores comerciais. Os pontos de fusão foram valorizados no ponto de fusão B-540 da Büchi (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos em espectros de um NMR de 400 MHz, Nuclear Bruker Ascend 400 Instrument (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros de ¹H e ¹³C NMR destes compostos são disponíveis na secção de Informação Suplementar (SI). Os espectros de infravermelhos foram obtidos numa Thermo Scientific Aparelho Nicolet 380 FT-IR (600-4000 cm⁻¹, Nicolet Instrument Corp., Madison, WI, EUA) utilizando o potássio método do disco de brometo (KBr, grau espectroscópico). O factor de protecção solar in vitro (FPS) e fotoestabilidade foram determinados pelo método espectrofotométrico desenvolvido por (Mansur et al). As leituras UV-Vis ultravioletas foram determinados na Thermo Scientific Genesys 10S espectrofotómetro (Waltham, Massachusetts, EUA). O tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de as nanoemulsões foram determinadas por correlação de fótons espectroscopia e microelectroforese associada a anemometria laser-Doppler no Zetasizer (Malvern, modelo Zetasizer Nano series-Nano ZS, Malvern, United Reino). Os espectros de massa de alta resolução (HRMS) foram adquiridos utilizando um LCMS-Q-ORBITRAP (Thermo Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA) espectrómetro de massa e as amostras foram solubilizados em acetonitrilo. O alto desempenho cromatografia líquida (HPLC) foi contornada e as amostras foram injectadas directamente no espectrómetro de massa.

5.1.1 Procedimento geral para a síntese de ésteres 1a-c

Num balão de fundo redondo (50 mL), foram adicionados 5 mL de piridina, 2,5 mL (1,77 mmol) de 2-hidroxiacetofenona e 2,0 ml (1,42 mmol) do cloreto de benzoíla necessário. A mistura foi mantida sob agitação durante aproximadamente 15 min a 25°C. Após este tempo, foi adicionado 1M HCl (60 mL) seguido de gelo picado. Em seguida, o sólido é filtrado e o precipitado lavado com metanol e água (1:1). O sólido obtido foi recristalizado com metanol.

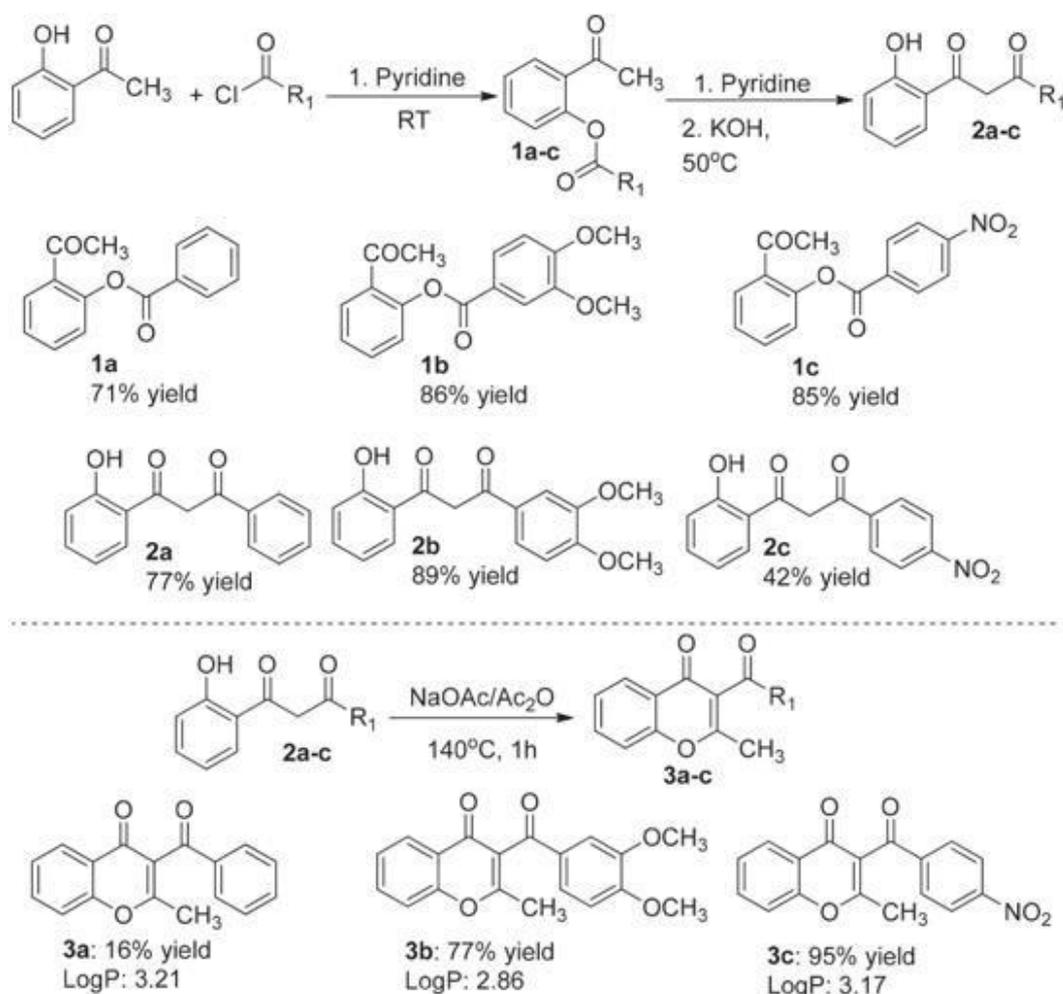
5.1.2 Procedimento geral para a síntese de dicetonas 2a-c

Num balão de fundo redondo (50 mL), foram adicionados 0,470g (1,56 mmol) de éster 1a-c, 1,10 mL de piridina e 0,175g (3,13 mmol) de KOH. A mistura foi mantida sob agitação durante aproximadamente 15 min a 50°C. Após a conclusão, a reação é resfriada num banho de gelo e 10% de ácido acético foi adicionado, resultando na precipitação de um sólido amarelo. O sólido foi filtrado e lavado com etanol frio e recristalizado com 70% de etanol aquoso para se obter um sólido amarelo. As dicetonas 2a-c foram confirmadas por comparação dos seus pontos de fusão com os valores da literatura.

5.1.3 Procedimento geral para a síntese de cromonas 3a-3c

Num balão de fundo redondo (50 mL) equipado com barra de agitação e condensador de refluxo foi adicionado 2 mmol de dicetona 2a-c, 2,4 mmol de acetato de sódio e 7 ml de anidrido acético. A mistura foi agitada durante 60 min a 140°C. Uma vez realizada, a solução de reação foi vertida em água e o precipitado formado foi filtrado e recristalizado com etanol aquoso para fornecer derivados de 3-benzoilcromona 3a-c.

Figura 5: Síntese de derivados de cromona: 1a-1c piridina, temperatura ambiente, 15 min; 2a-2c piridina, KOH, 50 °C, 15 min; 3a-3c NaOAc/Ac₂O, 140 °C, 1 h.



Fonte: Antunes et al, 2021

5.2. Determinação da absorvância dos compostos 3a-c

As medições de absorção foram realizadas num Espectrofotômetro de UV VIS. Para a determinação da absorvância na região UVA e UVB, 10 mg de cromona foram diluídos em 10 ml de metanol, resultando numa concentração de 1 mg/mL que foi novamente diluída em metanol para permitir concentrações diluídas de 0,025, 0,030, 0,050, 0,070 e 0,1 mg/mL. A varredura na região UVA e UVB foi realizada para cada concentração entre os comprimentos de onda de 200 e 600 nm no espectrofotômetro UV, utilizando uma cubeta de quartzo com

uma via óptica de 1 cm. O metanol foi utilizado como branco e a experiência realizada em triplicado (GONÇALVES et al, 2018).

5.3. Determinação in vitro do Fator de Proteção Solar (FPS) composto 3a-c

O FPS foi calculado para cada concentração (0,025, 0,030, 0,050, 0,070, 0,070 e 0,1 mg/mL.) pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur usando **Eq. (1)**.

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

Equação 1: Onde FC = 10 (constante), EE = efeito eritemogénico, I = Intensidade do sol e Abs = absorção da amostra. As leituras de absorção foram realizadas na gama de 290 a 320 nm com intervalos de 5 nm e adicionadas na Equação 1. As constantes EE e I foram pré-definidas por Mansur (1986), de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: EE e I constantes para o cálculo do FPS in vitro.

λ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
EE (λ) x	0.0150	0.08170	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180
Σ	1.0000						

Legenda: EE (λ) = efeito eritemogénico da radiação do comprimento de onda, I (λ) = intensidade solar no comprimento de onda (λ), λ = comprimento de onda (MANSUR et al, 1986)

5.4. Ensaio de Fotoestabilidade

A fotoestabilidade foi realizada utilizando uma câmara de luz com uma fonte de lâmpada UVB a 365 nm. Soluções de 0,07 mg/mL . Derivados de cromona (compostos 3a-c) foram preparados em metanol e colocados em frascos volumétricos sem tampa e expostos à radiação durante um tempo total de 1 h e 15 min, e avaliados a intervalos de 15 min após exposição à radiação UV. O sistema foi aberto durante a irradiação. (GONÇALVES et al, 2018)

5.5. Ensaio de Citotoxicidade

As células de fibroblastos humanos MRC-5, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma®), e distribuídas em placa de microtitulação de 96 poços utilizando uma densidade de 5×10^4 células/poço e após incubação a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 h. As células foram tratadas com a amostra dissolvida em RPMI 2% DMSO, em concentrações que variaram entre 1000,0 e 62,5. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de sulforodamina B (SRB). Após 24 h de incubação, os meios foram removidos e as células fixadas com ácido tricloroacético a 20% a frio durante 1h a 4°C. A placa de microtitulação foi lavada com água destilada e seca. Posteriormente, as células fixas foram coradas durante 30 min com 0,1% de SRB dissolvido em ácido acético a 1%. A placa será novamente lavada com 1% de ácido acético, novamente deixada secar e 200 µL de tampão TRIS 10 mM (pH 10,5) foram adicionados à solubilização da coloração à temperatura ambiente durante cerca de 30 min. A absorção das amostras foi lida no espectrofotômetro (490 nm) e os dados foram apresentados como a percentagem de células viáveis sobre as células não tratadas.

5.6. Preparação de Nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas de acordo com o método de Inversão de Fase de Emulsão (EPI) (PRIGENT et al, 1982). Para obter as formulações, a água destilada e a fase oleosa foram aquecidas separadamente a $75 \pm 2^\circ\text{C}$. A água foi lentamente vertida para a fase oleosa e o sistema mantido sob agitação constante a uma velocidade de 500 rpm. A agitação foi pré-formada até ser atingida uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 24h, todas as formulações foram avaliadas macroscopicamente. As composições testadas foram utilizado o Span 120-LQ-(MH) muito utilizado em formulações cosméticas que têm como função Emulsificante A/O para cremes emolientes e agente dispersante e molhante para filtros físicos. Foi utilizado o Ultramona RH 400, mais conhecido como óleo de rícino que têm a função nessa formulação de ser um tensoativo de carter iônico permitindo assim o uma aplicação como agente condicionante para a pele. Além disso foi utilizado o Oleo de Licuri, utilizado como emoliente onde promove uma boa espalhabilidade e alta penetração na pele quando utilizados em emulsões, e por fim foi utilizado a água como veículo. As composições testadas para nanoemulsões são descritas na **tabela 2**.

Tabela 2: Composição em porcentagem para a preparação da nanoemulsão com as cromonas 3a e 3b e os padrões.

	Nanoemulsão com 3a	Nanoemulsão com 3b	Nanoemulsão com P1	Nanoemulsão com P2	Fase
Span 120-LQ- (MH)	4%	4%	4%	4%	O
Ultramona RH 400	6%	6%	6%	6%	O
Oleo Licuri	10%	10%	10%	10%	O
Água destilada	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	A

Legenda: q.s.p = quantidade suficiente para completar 100 mL. F= fase: O = Oleoso, A= Aquoso. Cromonas: 3a e 3b (cromona e 3-aroilcromona) ; P1(padão 1) = Neo Heliopan® ; P2 (padão 2) = 3-Benzofenona.

5.7. Coeficiente do Log P

Utilizando o programa online Molinspiration, foi possível calcular o Log P da Cromona e seus derivados. Atraves da estrutura molecular dos produtos foi possível gerar um log P para cada composto.

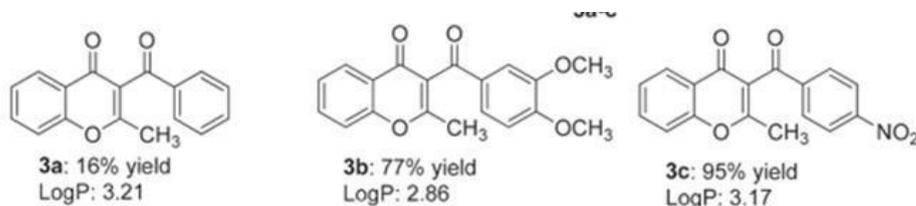
6 Resultados e discussão

6.1 Síntese da cromona e derivados

A Reação de esterificação dos reagentes 2-hidroxiacetofenona com cloreto de benzoila, produziu, inicialmente, os intermediários 1a, 1b e 1c. Tais intermediários sofreram um rearranjo de Backer-Venkataraman em contato com os reagentes piridina e hidróxido de potássio, produziu-se os intermediários 2a, 2b e 2c. Através dos dados de pontos de fusão dos compostos e da caracterização realizada através da técnica de RMN, foi possível confirmar a presença dos ésteres nos compostos 1a-1c e e as 1,3-dicetonas nos compostos 2a-2c, resultados gerados conforme a literatura. A reação dos compostos 2a-2c (1,3-dicetonas)

com anidrido acético e acetato de sódio, foi possível obter os compostos 3a-3c (3-benzoilcromona), sendo a Cromona 3b um produto inédito.

Figura 6: Estruturas dos compostos Sintetizados (3a-3c)



Os produtos sintetizados 3a-3c foram caracterizados através da técnica de espectrometria de Massas (EM), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (anexo). Nos espectros de IV foi possível observar uma banda de absorção em 1700 cm^{-1} indicando a presença de uma cetona conjugada. As bandas de absorção 3000, 1650, e 1450 cm^{-1} foram atribuídas a ligação C-H e C=C do anel benzeno. Os espectros de RMN apresentaram sinais característicos de singlete correspondente ao grupo metila com deslocamento químico em aproximadamente em 2,5 ppm. Já no espectro de carbono 13 o deslocamento químico para o carbono de metila foi registrado em 30 ppm.

6.1.1.3-Benzoyl-2-methyl-4H-chromen-4-one (3a)

Rendimento do produto 16,6%; mp 118-119 °C; UV-Vis (metanol) λ / nm 365; IR (KBr) ν / cm^{-1} 3000, 1700, 1650, 1500, 1450; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2,38 (s, 3H, H12), 7,39-7,61 (m, 3H), 7,68 (t, 2H, J 8,4 Hz), 7,71 (t, 1H, J 8,4 Hz), 7,90 (d, 2H, J 7,6 Hz), 8,16 (d, 1H, J 7,9 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 29,7, 117,9, 123,1, 125,5, 128,7, 130,0, 133,8, 136,9, 155,9, 165,4, 175,9, 193,9, de acordo com as figuras S1 e S2 (secção SI); HRMS tempo de ionização de voo por electrospray (ESI-TOF) m/z, calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3$ [M + H]⁺ 265.0859, encontrado: 265.0851

• 3-(3,4-Dimethoxybenzoyl)-2-metil-4H-chromen-4-one (3b)

Rendimento do produto 77%; mp 182-183 °C; UV-Vis (metanol) λ / nm 365; IR (KBr) ν / cm^{-1} 3000, 1700, 1650, 1500, 1450, 1250, 1000; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2,57 (s, 3H), 3,99 (s, 6H), 7,01 (d, 2H, J 8,5 Hz) 7,25 (d, 1H, J 8,7 Hz), 7,37 (t, 1H, J 8,4 Hz), 7,61 (m, 2H), 7,70 (d, 1H, J 2,0 Hz), 7,9 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 29,9, 56,1, 110,5, 112,4, 121,6, 123,9, 126,1, 130,2, 131,4, 133,4, 148,9, 149,5, 153,8, 164,9, 197,8, de acordo

com para as figuras S3 e S4 (secção SI); HRMS (ESI-TOF) m/z, calcd. para C₁₉H₁₇O₅ [M + H]⁺: 325.1071, encontrado: 325.1066.

- *2-Methyl-3-(4-nitrobenzoyl)-4H-chromen-4-one (3c)*

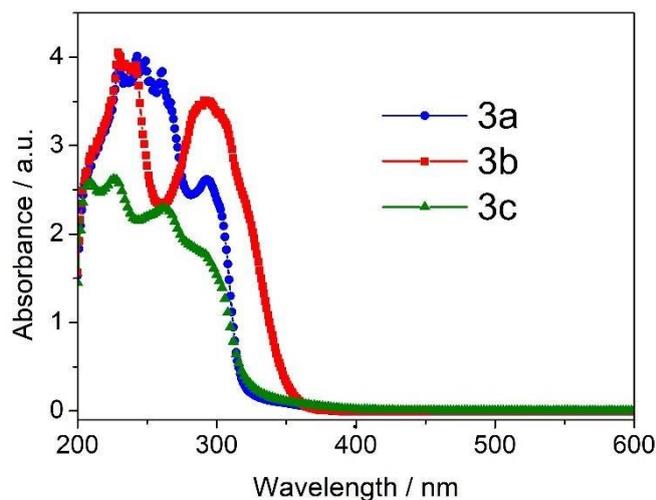
Rendimento do produto 95%; mp 198-199 °C (aceso 202-204 °C); 25 UV-Vis (metanol) λ / nm 365; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3000, 1700, 1650, 1500, 1450, 1400, 880; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2,51 (s, 3H), 7,46 (t, 1H, J 8,0 Hz), 7,53 (d, 1H, J 9,0 Hz), 7,75 (m, 2H), 8,03 (d, 2H, J 9,0 Hz), 8,16 (dd, 1H, J 8.0 e J 1.5 Hz), 8,32 (d, 2H, J 8.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 19,4, 117,9, 122,0, 123,4, 123,9, 125,9, 126,0, 130,0, 134,6, 142,1, 150,4, 155,9, 167,9, 175,9, 192,8, de acordo com as Figuras S5 e S6 (secção SI); HRMS (ESI-TOF) m/z, calcd. para C₁₇H₁₂NO₅ [M + H]⁺: 310.0710, encontrado: 310.0708.

A lipofilicidade dos derivados 3a-3c (3-benzoilcromona) é de suma importância para avaliar se os compostos serão absorvidos pela pele, assim, os valores de log de P para cada composto são: 3.21 (3a), 2.86 (3b), 3.17 (3c). O Log de P > 1 é indicativo de caráter lipofílico e o Log P < 1 é considerado de caráter hidrofílico (GONÇALVES et al, 2018). Estudos *in vivo* demonstraram que a Oxibenzona têm sido confirmada como um composto capaz de ser absorvido pela via transdérmica (REIS et al, 2014), e o Log P para esse composto foi calculado em 3.37, sendo muito semelhante aos 3 compostos 3a-3c sintetizados nesse trabalho. Foi calculado o coeficiente de partição log P octanol-água utilizando a calculadora Molinspiration Interactive Log P.

6.2 Fator de Proteção Solar (FPS)

A determinação do fator de proteção solar foi realizada através de leituras no espectrofotômetro de ultravioleta na região do visível (UV vis), em concentrações de 0.025, 0.030, 0.050, 0.070 e 0,1 mg/mL foram determinadas as absorbâncias da 3-Benzoyl-2-methyl-4H-chromen-4-one (3a), 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) e 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona (3c) e avaliadas pelo método de Mansur. O solvente utilizado foi o Etanol P.A, devido os produtos serem solúveis neste solvente e por não apresentar absorção na faixa de comprimento de onda entre 200 a 800nm (UVA e UVB). O mesmo foi submetido a uma varredura para a verificação de absorção no comprimento de onda utilizado de acordo com a literatura.

Figura 7: Espectro UV-Vis da solução dos compostos 3a-3c



As análises foram realizadas no espectrofotômetro ultravioleta (UV), onde os valores encontrados da absorvância, foram colocados na **equação 1** e conseqüentemente, gerados os valores de FPS, de acordo com a **tabela 3**. Neo Heliopan (P1) e 3- benzofenona (P2) foram utilizados como amostras padrões. Pela análise dos dados obtidos, verificamos que os produtos 3a e 3b, apresentaram um FPS proporcional à concentração analisada, ou seja, quanto maior a concentração não tóxica (de acordo com o teste de viabilidade celular), maior é o Fator de Proteção Solar. Os produtos 3a e 3b apresentaram um valor de FPS maior que padrão P2 utilizada na maioria dos protetores solares comerciais.

O produto 3b foi o que apresentou um melhor FPS, justamente por apresentar grupos metoxilas que fazem com que a absorvância seja maior nas leituras realizadas no espectrofotômetro. As metoxilas apresentam um efeito doador por ressonância para o anel e dessa forma faz com que a radiação UV seja absorvida e conseqüentemente aumenta o valor de FPS. Já o produto 3a, não possui nenhum substituinte em sua estrutura, e ainda sim apresentou um FPS maior que o produto 3c. Apesar de grupo nitro interagir com o anel aromático, ainda sim não aumentou a absorvância e nem o FPS. É possível notar que, tanto a 3-Benzoyl-2-methyl-4H-chromen-4-one (3a) quanto a 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b), apresentaram um valor de FPS muito maior que a 3- benzofenona, como dito anteriormente, utilizada na maioria dos protetores solares, sendo possível a sua substituição na comercialização de protetores solares.

Tabela 3: FPS dos compostos 3a-3c e dos padrões utilizados.

C	SPF-UVB - Compounds				
	3a	3b	3c	P1	P2
0.025	10.728 ± 0.004 ^a	11.035 ± 0.012 ^b	5.892 ± 0.010 ^c	34.912 ± 0.063 ^d	10.774 ± 0.049 ^a
0.030	11.787 ± 0.004 ^a	10.157 ± 0.018 ^b	8.856 ± 0.003 ^c	35.264 ± 0.053 ^d	11.607 ± 0.150 ^a
0.050	14.053 ± 0.015 ^a	22.515 ± 0.007 ^b	11.692 ± 0.006 ^c	36.027 ± 0.079 ^d	15.533 ± 0.001 ^e
0.070	20.312 ± 0.003 ^a	26.528 ± 0.008 ^b	14.157 ± 0.011 ^c	36.492 ± 0.059 ^d	17.596 ± 0.004 ^e
0.100	27.436 ± 0.032 ^a	28.844 ± 0.044 ^b	16.775 ± 0.002 ^c	36.817 ± 0.090 ^d	19.731 ± 0.006 ^e

C: Concentração (mg .ml-1); Cromonas (3a); 3-Aroilcromona (3b); 3-Nitrocromona (3c); P1 (padrão 1): Neo Heliopan®; P2 (padrão 2): 3-benzofenona; Resultados expressos como média ± desvio padrão; a-indicar p<0,05 na mesma linha pelo teste One-Way ANOVA.

6.3. Avaliação da Fotoestabilidade

A Cromona e 3-aroilcromona foram analisadas de forma separadas em uma avaliação de fotoestabilidade. As amostras foram dissolvidas em etanol em soluções com concentrações de 0,070 mg/mL. Os gráficos mostram como as soluções analisadas comportam-se durante um determinado tempo com a luz ultravioleta incidido sobre as mesmas. É possível observar que a 3-Benzoyl-2-methyl-4H-chromen-4-one (3a), apresentou uma estabilidade nos tempos 30, 45, 60 e 75 minutos. Houve uma variação nos tempos 0 e 15 minutos, onde o tempo 15 houve uma maior absorção da luz em relação aos tempos propostos. A 3-(3,4-Dimetoxibenzoil)-2-metil-4H-cromon-4-ona (3b) apresentou uma pequena queda de absorvências nos tempos de 45 e 75 minutos em relação aos demais tempos, que apresentaram por sua vez uma melhor estabilidade de acordo com o tempo de exposição a luz. Já a 2-Metil-3-(4-nitrobenzoil)-4H-cromon-4-ona apresentou uma queda no tempo inicial 0 e um aumento no tempo 15 minutos e os tempos 30, 45, 60 e 75 mostraram-se estáveis. Os produtos mostraram-se estáveis nos tempos de 30, 45 e 60 minutos na exposição da luz ultravioleta, podendo assim vir a ser um protetor solar.

Figura 8: Fotoestabilidade do composto 3^a (Cromo)

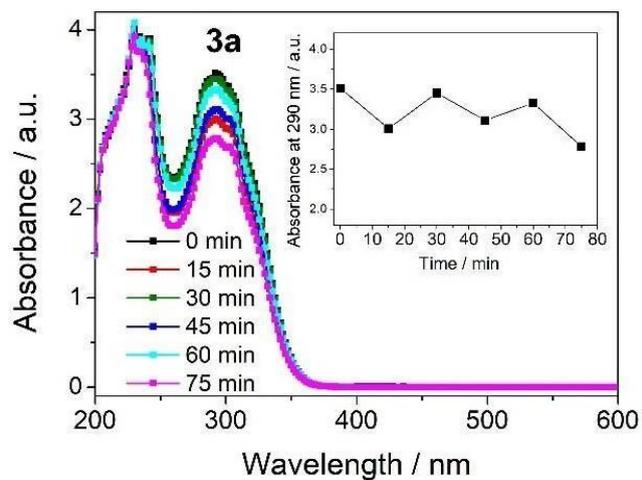


Figura 9: Fotoestabilidade do composto 3b (3-Aroilcromona).

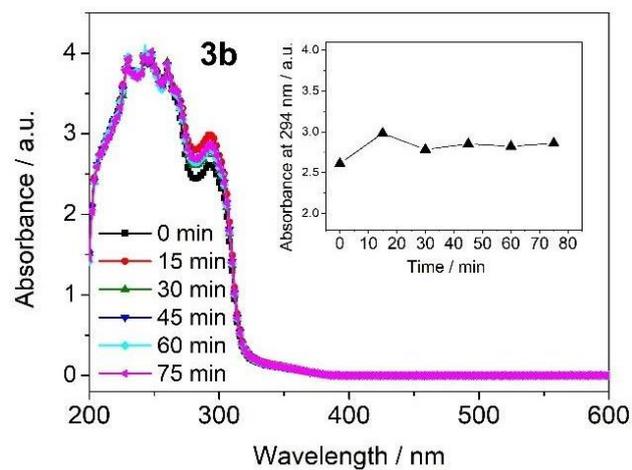
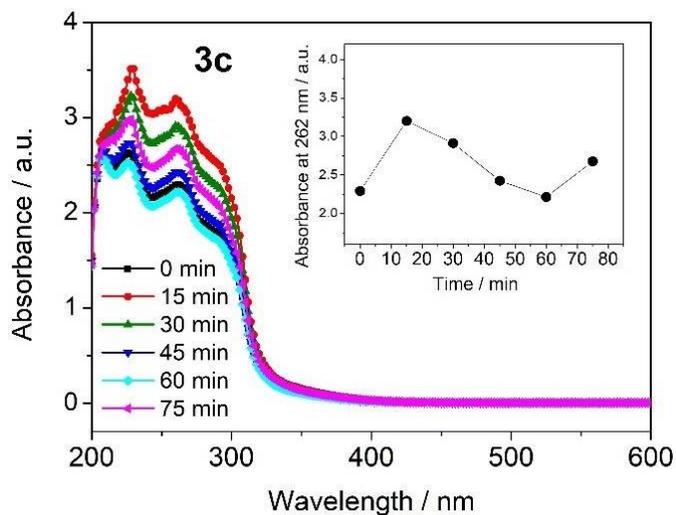


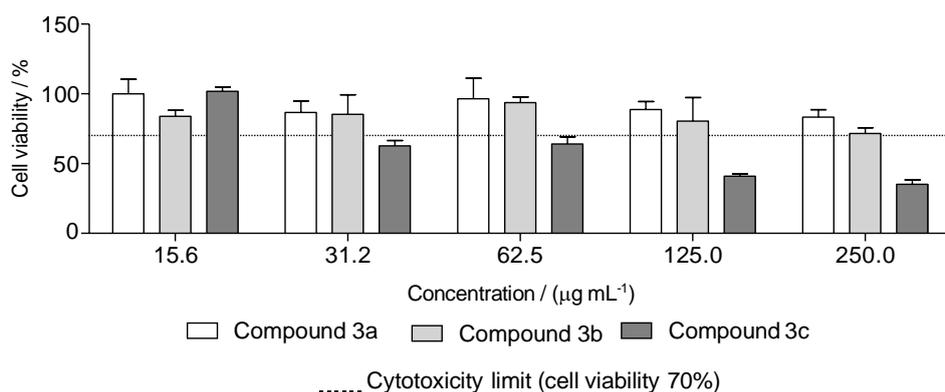
Figura 10: Fotoestabilidade do composto 3c (3-Nitrocromona).



6.4. Citotoxicidade

Os compostos 3a e 3b não apresentaram efeito citotóxico em relação aos fibroblastos humanos MRC-5 em concentrações testadas, de acordo com a ISO2009-10993-5. Por outro lado, o composto 3c exibiu maior toxicidade, já que em sua menor concentração 3c estava abaixo de 70% de viabilidade. Portanto, estes resultados indicam segurança dos compostos 3a e 3b na concentração utilizada para determinar seu valor de FPS ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), mas o composto 3c estava em contraste com o tóxico nesta concentração. Em vista destes resultados de citotoxicidade, juntamente com os valores de FPS (**Tabela 3**), o composto 3c tem o menor potencial para outras aplicações os compostos 3a e 3b foram selecionados para o desenvolvimento de nanoemulsões.

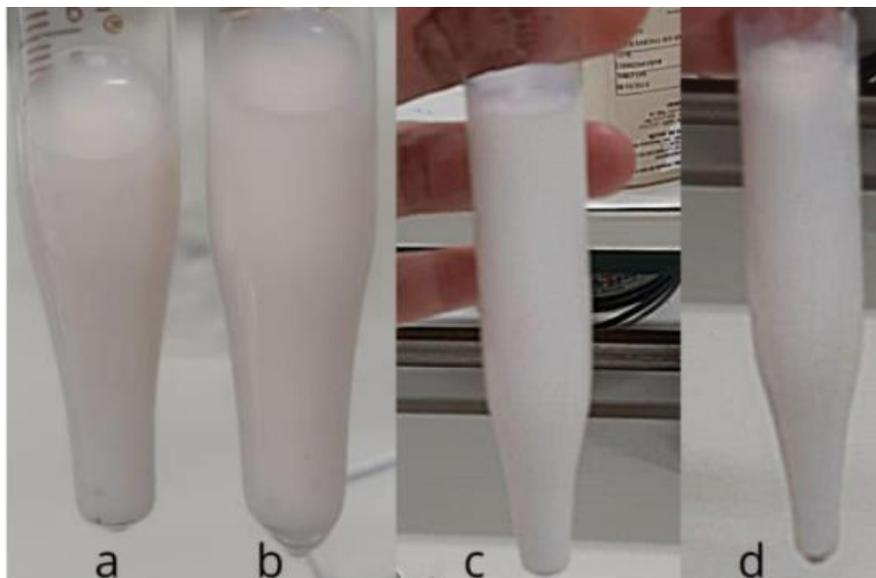
Figura 11: Citotoxicidade dos compostos 3a – 3c.



6.5. Nanoemulsão

Macroscopicamente, após 24 horas de preparação, as nanoemulsões permaneceram estáveis e com uma aparência ligeiramente leitosa, exceto o padrão P2, que tinha uma aparência mais leitosa, de acordo com a **figura 12**.

Figura 12: Nanoemulsões 24 h após a preparação: (a) compostos 3a; (b) compostos 3b; (c) padrão 2: benzofenona-3 e (d) padrão 1 = Neo Heliopan®.



Fonte: Antunes et al, 2021

Como pode ser visto na Tabela 4, as nanoemulsões contendo compostos 3a, 3b e padrão P1 apresentaram um tamanho médio de gota inferior a 150 nm e a nanoemulsão contendo o padrão P2 tinha um tamanho de $433,70 \pm 46,36$ nm. Os valores médios de tamanho de gotas obtidos estão de acordo com a faixa de tamanho estabelecida para as nanoemulsões (BOUCHAMA et al, 2003). Os valores PI das nanoemulsões 3a, 3b e P1 foram inferiores a 0,3, considerando a monodispersão (BOUCHAMA et al, 2003), que mostraram uma grande homogeneidade de tamanho de gotas. O tamanho das gotas de uma emulsão depende do método de emulsificação utilizado (KLASSEN et al, 2014). Os resultados demonstraram a eficiência do método de emulsificação por inversão de fase na obtenção de nanoemulsões com os compostos 3a e 3b

O pequeno tamanho das gotas presentes em uma nanoemulsão a estabiliza contra a separação da fase gravitacional e floculação, (MAHDI et al, 2011), além de permitir uma deposição mais uniforme na superfície da pele (MAHDI et al, 2011), promovendo a formação de uma película contínua e, conseqüentemente, melhorando a eficácia da nanoemulsão na proteção contra os raios UVA e UVB. (GONÇALVES et al, 2019)

Tabela 4. Tamanho médio, índice de polidispersidade e potencial zeta de nanoemulsões com Composto 3a, composto 3b e padrões.

Nanoemulsão	Tamanho Médio (nm) ± DP	IP ± DP	Zeta potencial (mV) ± SD
3a	144.40 ± 0.31	0.28 ± 0.03	-36.00 ± 1.16
3b	148.00 ± 0.70	0.26 ± 0.02	-36.70 ± 1.50
S1	135.60 ± 1.57	0.20 ± 0.01	-30.90 ± 1.94
S2	433.70 ± 46.36	0.57 ± 0.04	-35.70 ± 1.85

DP: desvio padrão; IP: índice de polidispersidade; Cromonas: 3a e 3b; S1 (padrão 1): Neo Heliopan®; S2 (padrão 2): 3-benzofenona.

O potencial zeta (carga superficial) de uma nanoformulação pode interferir com sua estabilidade. Se o valor do potencial zeta é relativamente alto (> 30 mV em módulo), as forças repulsivas excedem as forças atrativas de van der Waals, culminando na obtenção de um sistema eletrostático estável. Assim, uma maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas reduz a probabilidade de formação de agregados, evitando a floculação da nanoemulsão da superfície. (MARZUKIA et al, 2019) Todas as nanoemulsões produzidas tinham valores de potencial zeta maiores que -30 mV, o que contribui para manter a estabilidade destes sistemas. Após 24 horas, as duas nanoemulsões foram lidas para analisar o FPS usando a fórmula Mansur, como mostra a **tabela 5**.

Tabela 5: FPS das nanoemulsões de compostos e Padrões.

C (mg ml ⁻¹)	Nanoemulsão			
	P1	P2	3a	3b
0.025	36.348 0.001 ^a	± 11.130 0.008 ^b	± 12.894 0.001 ^c	± 13.889 0.001 ^d
0.030	36.917 0.001 ^a	± 13.118 0.001 ^b	± 19.561 0.001 ^c	± 23.745 ± 0.051 ^d
0.050	38.508 0.002 ^a	± 13.343 0.001 ^b	± 24.560 0.001 ^c	± 27.882 ± 0.037 ^d
0.070	43.492 0.001 ^a	± 20.769 0.001 ^b	± 35.439 0.006 ^c	± 37.938 ± 0.003 ^d
0.100	45.115 0.002 ^a	± 22.954 ± 0.004 ^b	37.98 ± 0.001 ^c	38.555 ± 0.002 ^d

C: Concentração (mg/ ml-1); Cromonas: 3a e 3b; Padrão 1= Neo Heliopan®; Padrão 2: 3-benzofenona. Resultados expressos como média ± desvio padrão; Letras diferentes indicam p<0,05 na mesma linha pelo teste One-Way ANOVA

Em vista da tabela acima, foi possível observar que entre os derivados, o mais proeminente foi a nanoemulsão contendo 3b. Na concentração máxima de 0,1mg / mL, a 3a tem um FPS de 37,98 e a 3b tem um FPS de 38,55.

7. Conclusão

O estudo de fotoproteção realizado de acordo com a metodologia Mansur mostrou aplicações promissoras para o composto 3b, que apresentava valores de FPS semelhantes ao benzofenona-3. Além disso, o teste de fotoproteção sugere que o composto 3b é estável com apenas uma pequena queda em sua absorção nos primeiros 15 minutos de exposição à luz UV. Os derivados da Cromona 3a e 3b são compostos promissores que podem ser incorporados em formulações de protetores solares. A cromona 3b, assim como o composto 3a, não apresentaram efeito citotóxico aos fibroblastos humanos MRC-5 em concentrações testadas, indicando um grande potencial para ensaios clínicos. Finalmente, os compostos 3a e 3b foram incorporados em nanoemulsões estáveis, com uma pequena média de gotas e alto valor de FPS, sendo fortes candidatos para o desenvolvimento de formulações de protetores solares.

Realizar esse projeto me abriu portas que jamias imaginei que abririam, dentro desses cinco

anos pude participar de congressos, cresci como pessoa e principalmente como pesquisadora. Pude acompanhar de perto outros projetos e contribuir com os mesmos, contribuições estas que geraram artigos. A experiencia dentro de um laboratório me mostrou um lado profissional que hoje posso colocar em prática no meu estágio. Fazer parte da iniciação científica foi uma experiencia incrível, poder contribuir com a ciência e levar inovação para a sociedade é uma sensação indescritível que todos deveriam sentir. Sou grata por todo esse tempo e por cada contribuição com este trabalho.

8 Anexos

Figura 13. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do compost 3a.

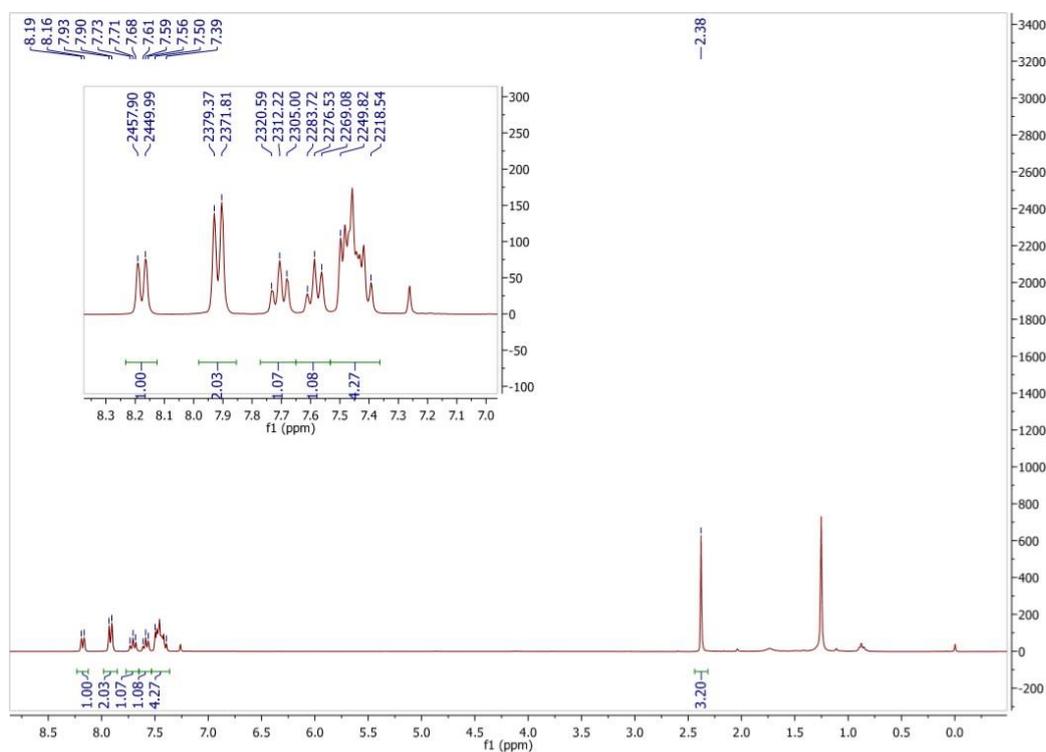


Figura 14. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do compost 3a.

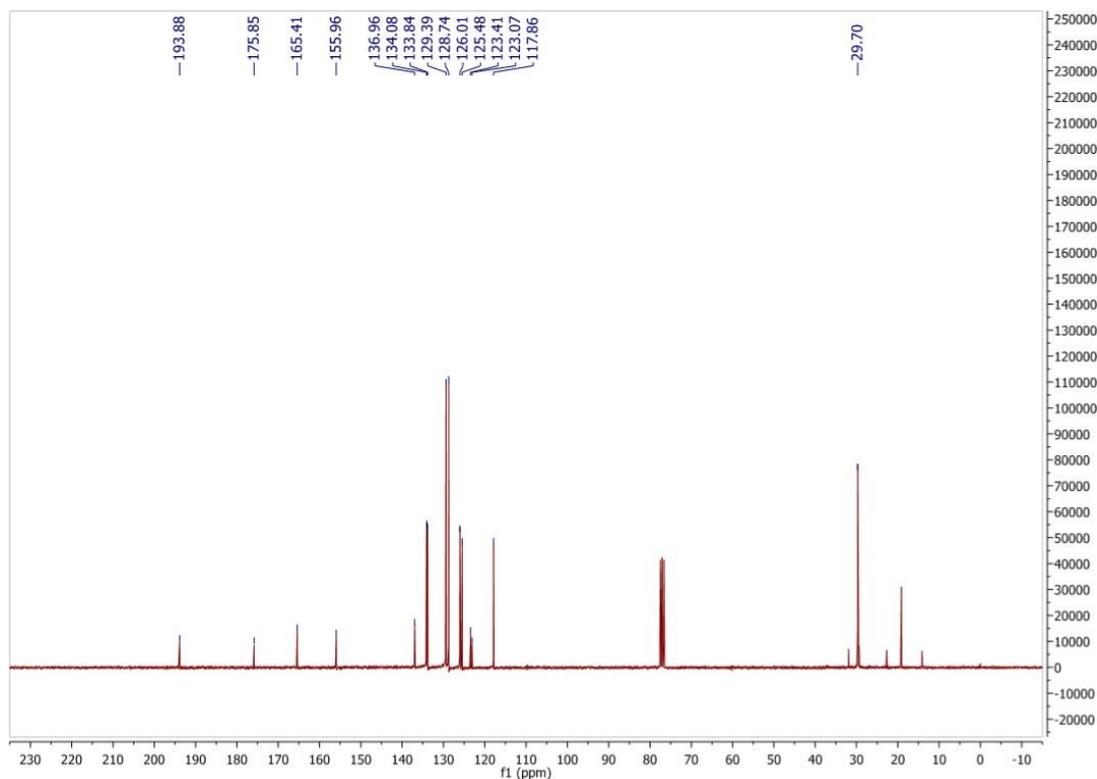


Figura 15. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do compost 3b.

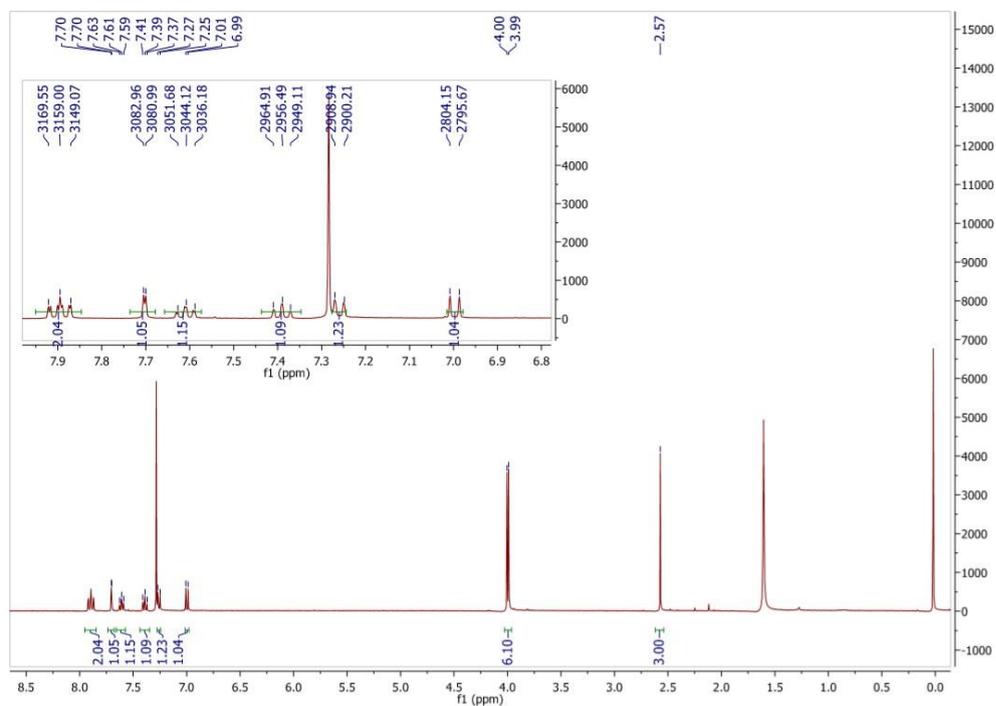


Figura 16. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do compost 3b.

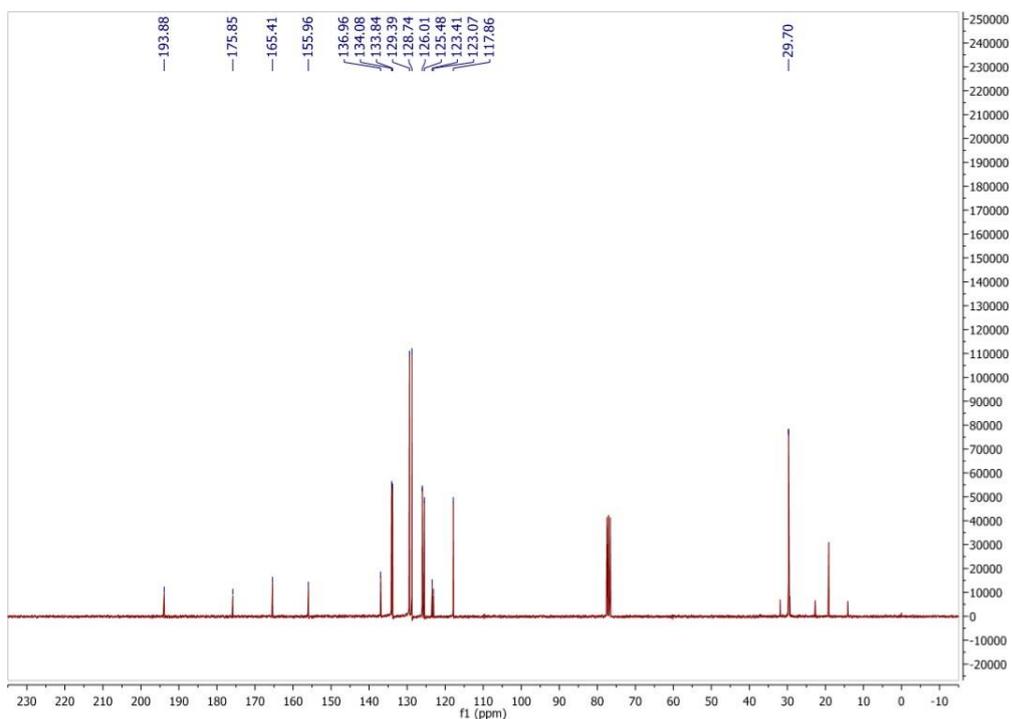


Figura 17. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 3c

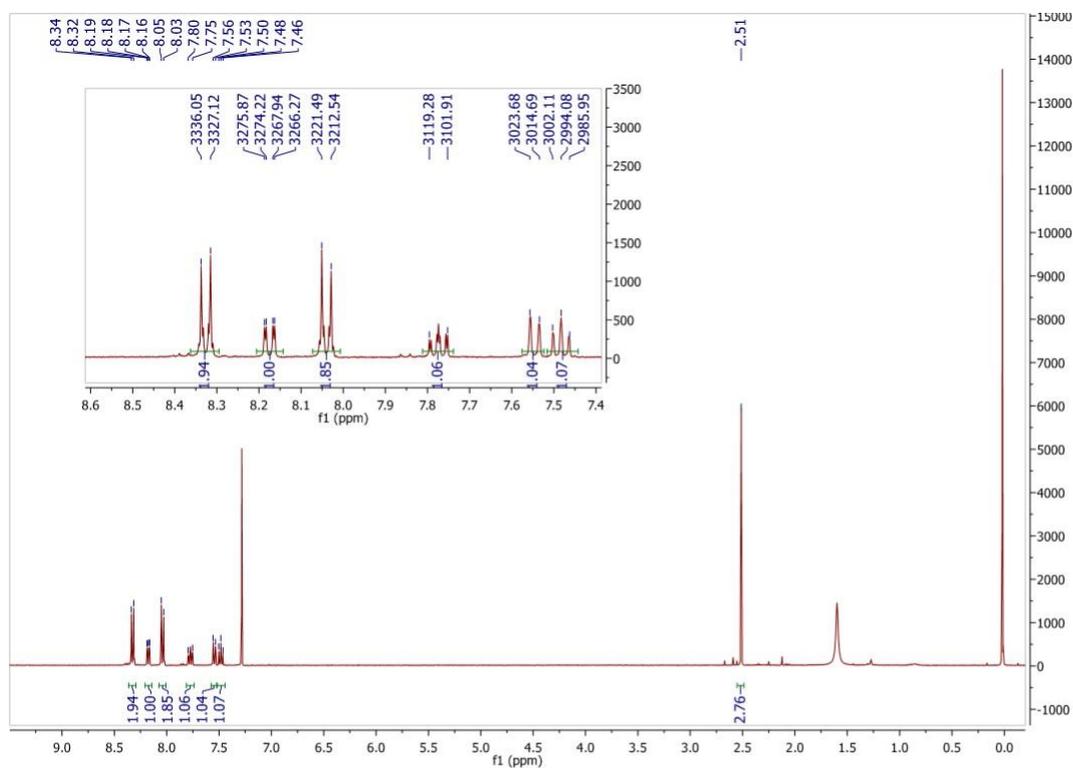
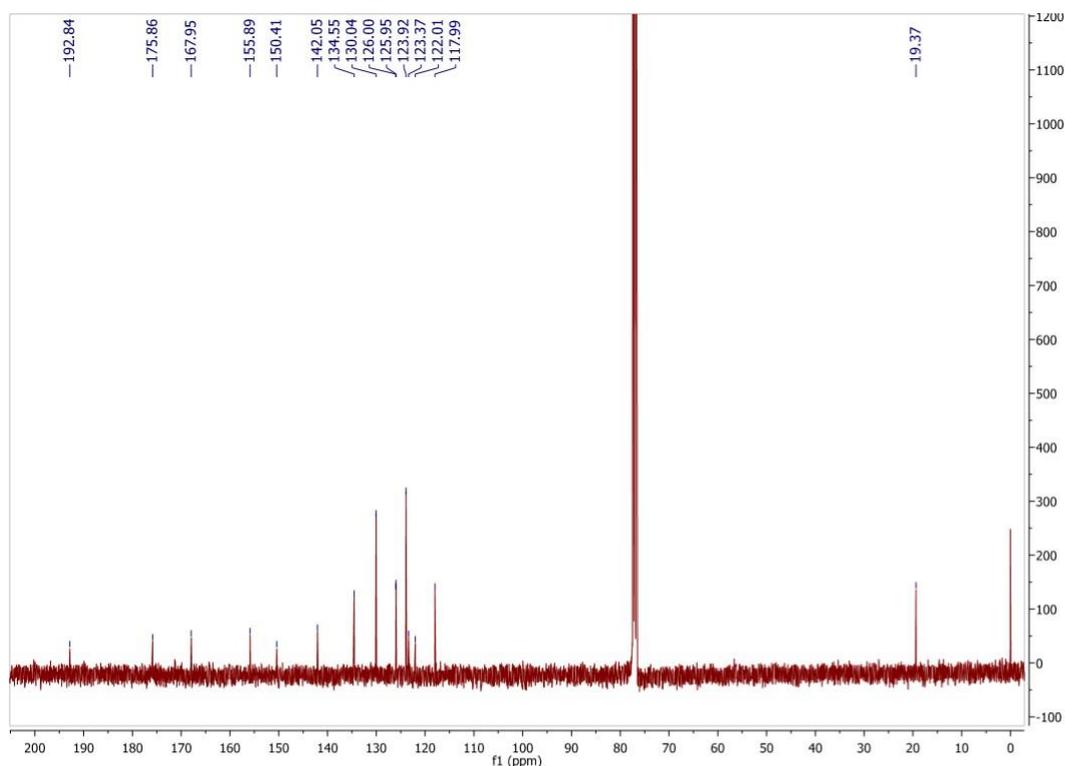


Figura 18. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do compost 3c.



9 Referências

ANTUNES, A. S. et al. **In vitro Photoprotective Evaluation and Development of Novel Nanoemulsion with Chromone Derivative.** J. Braz. Chem. Soc, 2021. Vol. 32, No. 9. pag 1813-1821. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210072>. Acesso em: 17 de outubro de 2021.

ARAÚJO, T. S & S. O. de Souza. **Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta:** Revista Scientia plena, 2008. Vol.4, nº 11.

FILHO, P.T. Asma Bronquica- Tratamento da asma com cromona. Rev Medical. 2018. Disponível em: https://www.asmabronquica.com.br/medical/tratamento_asma_cromonas.html. Acesso em: 26 de março 2021.

BACARDIT A, Cartoixà X.. Revisiting the Role of Irradiance in the Determination of Sunscreens' Sun Protection Factor. J Phys Chem Lett, 2020. Vol11(4). pag1209-1214.

BORASE, H. P., Patil, C. D., Salunke, R. B., Suryawanshi, R. K., Salunke, B. K., Patil, S. V. PatilPhytolates synthesized gold nanoparticles as novel agent to enhance sun protection factor of commercial sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* , 2014.. volume 36. pag571–578.

BOUCHAMA, F.; Aken, G.; Van, A. A. J.; Koper, G. J.; **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 2003, Vol11. Pag 231 .

CABRAL, L. D, et al.. **Filtros solares e fotoprotetores – uma revisão.** *Revista Científica do ITPAC*, 2013. Vol 25. pag107-110. .

DINARDO, J.C. and Down, A. C. **Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3.** *J Cosmet Dermatol*, 2017. 1–5 p

ERGINDEMIR, H. N.; Aker, A.; Hamitbeyli, A.; Ocal, N. **Synthesis of Novel UV Absorbers Bisindolylmethanes and Investigation of Their Applications on Cotton-Based Textile Materials.**; *Molecules* 2016, vol 2. pag21.

EDEOGA, H. O., Okwu, D. E., Mbaebie, B. O. **Phytochemical constituents of some Nigerian Medicinal plants.** *African Journal of Biotechnology*, 2005. vol 4. pag 685-688.

GONÇALVES, M.C. et al. **Estudos Preliminares da Citotoxicidade e Propriedades Fotoprotetoras de Derivados de Benzofenonas e Lactonas.** *Rev. Virtual Quim* 2018. Vol 10. pag 600-608.

GUOBI CHAI, et al. - **Efficient Assembly of Chromone Skeleton from 2,3-Alleloic Acids and Benzynes** - *ORGANIC LETTERS* 2011, Vol. 13, No. 19. Pag 5196-5199

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de pele não melanoma** - versão para Profissionais de Saúde. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>. Acesso em: 26 de março de 2021

JENJOB R, Phakkeeree T et al. **Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles.** *Macromol Biosci.* 2019 Jun;19(6) Disponível em: doi: 10.1002/mabi.201900063. Acesso em: 24 de abril 2021. PMID: 31016873.

JAIN, A. C.; Sarpal, P. D., Seshadri, T. R. **Synthesis of Afromisin Using Chalcone Epoxide Method.** *Indian Journal of Chemistry*, 1965. Vol 3. pag 369-373 .

- KLASSEN, P. L. et al. **PIT tuning effects of hydrophobic co-surfactants and drugs** ;Colloids and Surfaces A **2014.Vol. 1.** Pag 455.
- LEITE FILHO, C. A. et al. **Síntese de derivados da Vanilina e Avaliação como agentes fotoprotetores frente à radiação UVB.** Rev. Virtual Quim, . 2016.vol 8, pag 2057. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160138>. Acesso em: 26 de janeiro de 2021.
- LEE, J., et al. **An Efficient Synthesis of Flavones from 2-Hydroxybenzoic Acids.** In Bulletin of the Korean Chemical Society, 2004. Vol. 25: pag 1945-1947 . <https://doi.org/10.5012/bkcs.2004.25.12.1945>
- MATHEUS, L.G.M. & A.K. Kurebayashi. **Fotoproteção – A radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos.** São Paulo: Tecnopress Editora, 2002, pag. 85.
- MANSUR, J. S. et al. **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.** An Bras Dermatol, 1986. Vol. 61. pag121 –124 .
- MENEZES, J. C. L. et al. **Synthesis and Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Diaryldiazepines.** Molecules, 2015. Vol 20(1). pag43-51.
- MAHDI, E. S. et al. **Formulation an in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local Phyllanthus urinaria for skin antiaging.** International Journal of Nanomedicine, 2011. Vol6 pag2499. Disponível em: DOI: [10.2147/IJN.S22337](https://doi.org/10.2147/IJN.S22337). Acesso em: 26 de janeiro de 2021
- MARZUKIA, N. H. C. et al. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. Biotechnology & Biotechnological Equipment **2019. Vol 33.** pag 779. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>. Acesso em: 25 de julho de 2021.
- NARENDHIRAKANNAN, R. T., Hannah, M. A. C. Indian J Clin Biochem. 2013. **Oxidative Stress and Skin Cancer: An Overview.** Indian J Clin Biochem, 2013. Vol 28. pag 110–115.
- NASCIMENTO, L. F. et al.; **Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica.** Revista Virtual de Química 2014. Vol 6. pag190.

POLONINI, C. P. et al.. **Synthesis and evaluation of octocrylene-inspired compounds for UV-filter activity**. Quim. Nova., 2014. Vol 37. pag1004-1009.

PINHO, J. de J. R. G. et al. . Determinação do fator de proteção solar (in vitro) de produtos magistrais na forma de gel . avaliação dos aspectos sensoriais e físico-químicos. HU Revista,2014. Pag 81–88.

PRIGENT, A.F., Nemoz, G., Andre, A.C, Pacheco, H. **Pentasubstitutedquercetin analogues as selective inhibitors of particulate 3':5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from rat brain**. Journal of medicinal chemistry, 1982. Vol. 25. pag 1192-1198 .

REIS, J. S.et al. Synthesis, antioxidante and photoprotection activities of hybrid derivatives useful to prevent skin câncer. Bioorganic & Med. Chemistry, 2014. Vol 22.pag 2733-2738. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.017>. Acesso em: 16de maio de 2020.

ROYER M, et al.. **Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species**. PharmaNutrition, 2013; vol. 1: pag 158–167.Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.05.001>. Acesso em: 07 de agosto de 2021

RIBEIRO, R., Santos, V., & MEDEIROS, E. (2004). **Avaliação do fator de proteção solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento**. Pharm Bras, 88. Disponível em: <http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/79/25-fatorsolar.pdf>. Acesso em: 16 de setembro de 2021.

SINGH R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Exp Mol Pathol. 2009; 86:215–223.

SCHALKA, S., & dos Reis, V. M. S. **Fator de proteção solar: Significado e controvérsia**. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2011 86(3), 507–515. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300013>. Acesso em: 07 de agosto de 2021.

SHAATH, N. A.**The encyclopedia of ultravioleta filters**. Photochem Photobiol Sci, 2010. Vol. 9. Pag 464-9 : New York.

VICENTINI, F.T.M.C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**. 2009. 150 f .

Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.