

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA TONELLO BIFFI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE *Myrciaria dubia* EM CULTURA DE CÉLULAS EXPOSTAS A RADIAÇÃO UVB

FRANCISCO BELTRÃO

2022

MARIANA TONELLO BIFFI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE *Myrciaria dubia* EM CULTURA DE CÉLULAS EXPOSTAS A RADIAÇÃO UVB

Evaluation of the photoprotective potencial of *Myrciaria Dubia* extract in cultures of cells exposed to UVB radiation

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Elisângela Düsman

Coorientadores: Prof. Dr Guilherme Bertoldo e Prof^ª. Dr^ª Irede Angela Lucini Dalmolin

FRANCISCO BELTRÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MARIANA TONELLO BIFFI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE *Myrciaria
dubia* EM CULTURA DE CÉLULAS EXPOSTAS A RADIAÇÃO UVB**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR)

Data de aprovação: 08 de dezembro de 2022

Elisângela Düsman

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão

Guilherme Bertoldo

Doutorado

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão

Patrícia Aline Bressiani

Graduação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão

“A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

FRANCISCO BELTRÃO

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por toda força e sabedoria para lidar com todos os desafios durante a graduação e por não me deixar sozinha nos momentos mais difíceis.

Quero agradecer a minha família, especialmente meu pai Dirceu e minha mãe Geneci, por serem meu porto seguro, meus exemplos de coragem, força, dedicação e amor e a quem devo todas as minhas conquistas. Ao meu irmão Bruno, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Ao meu companheiro João por todo incentivo, carinho e cuidado.

Gostaria de agradecer às minhas amigas de laboratório, Anna Karolina, Sabrina, Ingrithy, Evellin e Ágatha, por estarem comigo durante a graduação e realização desse projeto. E em especial, minha amiga e irmã de coração Patrícia, por tornar essa jornada mais feliz e leve. Obrigada por toda ajuda, cuidado, carinho, paciência e bom humor.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Elisângela Düsman, por ter acreditado em mim, por todas as oportunidades e ensinamentos, pelo carinho, preocupação e paciência. Agradeço também aos meus coorientadores, Prof Dr. Guilherme Bertoldo e Prof. Dra. Irede Ângela Dalmolin por não medirem esforços para me ajudar na realização desse projeto. E também a Prof. Dra. Maria Helene toda ajuda para o desenvolvimento desse projeto.

À todos que colaboraram, de alguma maneira, para o desenvolvimento deste trabalho e não foram citados.

O presente trabalho recebeu recursos financeiros provenientes do Edital 07/2022 DIRGRAD/DIRGE da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR-FB - Apoio à execução de trabalhos de conclusão de cursos.

RESUMO

O Camu-Camu (*Myrciaria Dubia*) é um fruto de origem amazônica que apresenta elevados níveis de ácido ascórbico e compostos fenólicos em sua composição, que possuem a capacidade de diminuir o estresse oxidativo e auxiliar o sistema imunológico contra os danos causados pela exposição à radiação ultravioleta. Com isso, o objetivo do presente estudo foi produzir e caracterizar um extrato hidroalcolólico de Camu-Camu e avaliar seu potencial fotoprotetor, em tratamentos simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento, para as células renais de *Macaca mulatta* (LLC-MK2) expostas a radiação ultravioleta do tipo B (UVB). O planejamento experimental para a produção do extrato, um DCCR (delineamento composto central rotacional) 2^2 com duas variáveis independentes (tempo de extração e concentração do solvente), mostrou que o tempo de 20 minutos e 50% etanol e 50% água foram as melhores condições de extração sólido-líquido, em termos de compostos fenólicos. A determinação da capacidade antioxidante do extrato final resultou em EC50 de $100 \pm 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a análise físico-química mostrou que o extrato possui caráter ácido, com valor de pH 2,94, 10,68% de acidez total e ácido ascórbico de $3504,788 \pm 63,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de extrato. O teste de citotoxicidade do MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 brometo de difenil tetrazólio) com as células LLC-MK2 mostrou que o extrato do fruto não foi citotóxico para essa linhagem celular, mas os níveis de radiação (30, 60, 90, 120 e 150 mJ cm^{-2}) promoveram mortalidade destas células. Para os testes de citoproteção foi necessária a projeção e construção de uma câmara de radiação. Os resultados dos testes mostraram que as concentrações de 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do extrato de Camu-Camu foram capazes de promover a fotoproteção para a linhagem celular LLC-MK2 exposta a 30 mJ cm^{-2} da radiação UVB. Além disso, o pós-tratamento (Camu-Camu) tratado 2 horas após a exposição das células a radiação) foi o que apresentou os melhores resultados em termos de citoproteção. Assim, os dados do presente estudo demonstraram que esse fruto merece destaque na pesquisa de tratamentos para prevenir os danos gerados pela exposição à radiação ultravioleta.

Palavras-chave: fotoprotetores; radiação ultravioleta; *Myrciaria Dubia*; MTT.

ABSTRACT

Camu-Camu (*Myrciaria Dubia*) is a fruit of Amazonian origin that has high levels of ascorbic acid and phenolic compounds in its composition, which have the ability to reduce oxidative stress and help the immune system against damage caused by exposure to radiation ultraviolet. Thus, the objective of the present study was to produce and characterize a hydroalcoholic extract of Camu-Camu and to evaluate its photoprotective potential, in simultaneous treatments, pre-treatment and post-treatment, for exposed renal cells of *Macaca mulatta* (LLC-MK2) type B ultraviolet radiation (UVB). The experimental design for the production of the extract, a DCCR (rotational central composite design) 2^2 with two independent variables (extraction time and solvent concentration), showed that the time of 20 minutes and 50% ethanol and 50% water were the best solid-liquid extraction conditions, in terms of phenolic compounds. The determination of the antioxidant capacity of the final extract resulted in an EC₅₀ of $100 \pm 3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the physical-chemical analysis showed that the extract has an acidic character, with a pH value of 2.94, 10.68% of total acidity and $3504.788 \pm 63.5 \text{ mg ascorbic acid } 100 \text{ mL}^{-1}$ of extract. The MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) cytotoxicity test with LLC-MK2 cells showed that the fruit extract was not cytotoxic for this cell lineage, but the radiation levels (30, 60, 90, 120 and 150 mJ cm^{-2}) promoted mortality of these cells. The design and build of a radiation chamber were necessary to conduce the cytoprotection tests. The tests results showed that concentrations of 10, 25, 50 and $75 \mu\text{L mL}^{-1}$ of Camu-Camu extract were able to promote photoprotection for the LLC-MK2 cell line exposed to 30 mJ cm^{-2} of UVB radiation. Furthermore, the post-treatment (Camu-Camu treated 2 hours after exposing the cells to radiation) showed the best results in terms of cytoprotection. Thus, the data from the present study demonstrated that this fruit deserves attention in the search for research of treatments to prevent damage caused by exposure to ultraviolet radiation.

Keywords: photoprotectors; ultraviolet radiation; *Myrciaria Dubia*; MTT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Experimentos delineados pelo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2 ² com duas variáveis independentes	18
Tabela 2 - Diluições do extrato de Camu-Camu para a análise da atividade antioxidante	21
Tabela 3 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio do delineamento experimental com duas variáveis independentes	26
Tabela 4 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	27
Tabela 5 - Análise de variância do modelo de concentrações de compostos fenólicos obtidos pelo delineamento experimental de extração sólido-líquido do Camu-Camu.....	28
Tabela 6 - Atividade antioxidante das diluições do extrato final de Camu-Camu.....	30
Tabela 7 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT	32
Tabela 8 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2, tratadas diferentes intensidades de radiação (mJ cm^{-2}) por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT	34
Tabela 9 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao pré-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu antes da exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	36
Tabela 10 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao tratamento simultâneo com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu e a radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	38
Tabela 11 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao pós-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu após a exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camu- Camu (<i>Myrciaria dubia</i>).....	15
Figura 2 - Curva padrão de ácido gálico para a concentração de compostos fenólicos totais do extrato do Camu-Camu.....	20
Figura 3 - Projeto da câmara de radiação	22
Figura 4 - Esquema representativo do tratamento de citoproteção	24
Figura 5 - Gráfico de pareto para a determinação de fenólicos totais	27
Figura 6 - Perfil de resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração	29
Figura 7 - Curva padrão do DPPH.....	29
Figura 8 - Câmara de radiação.....	31
Figura 9 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato de Camu-Camu.....	32
Figura 10 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes intensidades de radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	34
Figura 11 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao pré-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu antes da exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	36
Figura 12 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao tratamento simultâneo com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu e a radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	38
Figura 13 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao pós-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu após a exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2}).....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 Radiação Ultravioleta (RUV) e seus efeitos	12
3.2 Câmaras de radiação ultravioleta	13
3.3 Antioxidantes e Vitamina C	14
3.4 Camu-Camu	15
3.5 Extração de compostos	16
3.6 Atividades biológicas em cultura de células	17
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	18
4.1 Obtenção do Camu-Camu	18
4.2 Obtenção do extrato	18
4.3 Análises físico-químicas e de compostos bioativos	19
4.3.1 Análise de compostos fenólicos totais	19
4.3.3 Análises físico-químicas	21
4.4 Montagem da câmara de radiação	21
4.5 Cultivo das células	22
4.6 Teste de citotoxicidade do MTT	22
4.6.3 Análise estatística	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Determinação da condição de extração sólido-líquido do Camu-Camu	26
5.2 Atividade antioxidante	29
5.4 Câmara de radiação	31
5.5 Teste de citotoxicidade	31
5.6 Testes de citoproteção	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A radiação oriunda do sol na faixa de comprimento de (200 – 400 nm) é conhecida como radiação ultravioleta (RUV). Esse tipo de radiação é indispensável para manutenção da vida na Terra, porém, a exposição indevida pode acarretar prejuízos à saúde dos seres humanos. A RUV é dividida em três faixas distintas, sendo que a faixa compreendida entre 280 – 320 nm é chamada de radiação ultravioleta B (UVB), a qual é responsável pelo estímulo da síntese da vitamina D no organismo, mas, também, é um agente que pode ser responsável por ocasionar várias doenças (SAMBANDAN; RATNER, 2011; ZAWROTNIAK; BARTNICKA; RAPALA-KOZIK, 2019).

Nas últimas décadas houve um aumento de diagnósticos de câncer de pele e outras doenças relacionadas a RUV, em especial a UVB, sendo esses relacionados com a mudança no estilo de vida da população, a qual tem se exposto por mais tempo a radiação e, também, o aumento da expectativa de vida que foi verificado globalmente (INCA, 2021).

A UVB está ligada diretamente ao aparecimento de queimaduras solares, eritemas, fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese, além de ser um potente imunossupressor. O desenvolvimento de protetores solares de uso tópico não diminuiu o número de diagnósticos desses casos, por isso a busca por bioativos com um potencial fotoprotetor vem sendo estudada nos últimos anos. Compostos com atividade antioxidante tem a capacidade de aumentar a resistência das células e diminuir o estresse oxidativo causado pela exposição à radiação UVB, além de contribuírem para um melhor funcionamento do sistema imunológico (ADDOR; CAMARANO; AGELUNE, 2013; CAMPONOGARA; OLIVEIRA, 2022; TOSATO *et al.*, 2015).

A *Myrciaria dubia*, mais conhecida como Camu-Camu, é um fruto de origem amazônica e ficou conhecido pelo seu alto teor de antioxidantes, com destaque para a vitamina C, além de apresentar vitamina E, β -caroteno, antocianina e vários compostos fenólicos (FIDELIS *et al.*, 2020). Segundo Addor, Camarano e Agelune (2013) a ingestão desses compostos possui um potencial fotoprotetor.

O isolamento de compostos bioativos presentes em plantas geralmente é realizado por meio da extração sólido-líquido utilizando solventes de diferentes polaridades (ANDREO; JORGE, 2006; OCHOA-VELASCO *et al.*, 2019). O planejamento experimental é de suma importância para aumentar a eficiência do processo, melhorando a qualidade do extrato, evitando a degradação dos compostos de interesse e possibilitando o isolamento efetivo desses. Um dos métodos mais utilizados é o planejamento fatorial que permite avaliar o efeito de vários

fatores sobre uma variável resposta simultaneamente e com a vantagem de necessitar de poucos ensaios experimentais (SILVA, 2008; OLIVEIRA, 2014).

Uma das formas de se avaliar a qualidade dos extratos obtidos é testar suas atividades biológicas. O ensaio do MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 brometo de difenil tetrazólio) é um método capaz de gerar resultados precisos nessas análises. Sendo esse utilizado para avaliação da viabilidade celular, possibilitando averiguar a saúde das células (NGA *et al.*, 2020).

No Brasil, a avaliação da eficácia de fotoprotetores exigida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é feita em voluntários que recebem o tratamento em determinada região do corpo e depois passam pela exposição à diferentes doses de radiação por uma simulação do espectro da luz solar, porém, esse tipo de avaliação não permite avaliar os efeitos da RUV nas células e, principalmente, no DNA (ácido desoxirribonucleico), que podem ser afetadas muito tempo antes das manifestações dos danos na pele. Por esse motivo, estudos que utilizam testes *in vitro* para avaliação do potencial fotoprotetor vêm sendo realizados, de forma a padronizar a utilização de parâmetros precoces que identifiquem as lesões provocadas pela exposição a RUV (FRUET, 2015).

Assim, o objetivo do presente estudo foi produzir e caracterizar um extrato hidroalcolólico de Camu-Camu e avaliar o efeito fotoprotetor do mesmo para as células renais de *Macaca mulatta* (LLC-MK2) expostas a radiação UVB, por meio de teste de viabilidade celular do MTT.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar um extrato hidroalcolico de *Myrciaria dubia* e avaliar seu efeito fotoprotetor em cultura de células expostas à radiação UVB.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir um extrato hidroalcolico de *Myrciaria dubia* pela técnica de extração sólido-líquido;
- Otimizar os parâmetros de extração pela maior quantidade de compostos fenólicos extraídos;
- Caracterizar o extrato em termos físico-químicos;
- Montar uma câmara de radiação ultravioleta do tipo B;
- Programar um código no Arduino para monitorar a intensidade de radiação ultravioleta do tipo B;
- Avaliar a viabilidade celular das células expostas à radiação UVB na câmara de radiação;
- Avaliar a viabilidade celular das células expostas ao extrato de *Myrciaria dubia*;
- Avaliar o efeito citoprotetor do extrato de *Myrciaria dubia* frente à radiação UVB na câmara de radiação;
- Testar tratamentos fotoprotetores dos tipos simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Radiação Ultravioleta (RUV) e seus efeitos

A luz solar apesar de ser uma fonte vital de energia traz consigo diversos efeitos nocivos aos seres humanos. Os feixes de luz com comprimento de onda menores que 400 nm, chamados de raios ultravioletas, são uma pequena porção de toda radiação emitida pelo sol, porém, podem trazer grandes prejuízos à saúde dos organismos vivos (DAFRE; MARIS, 2013; PEDERSEN; HANSEN, 2022).

Estima-se que 5% da RUV que atinge a terra esteja em uma faixa de comprimento de 280 – 320 nm, denominada UVB. Esse tipo de radiação possui raios mais energéticos e um menor poder de penetração atingindo principalmente a epiderme e interage diretamente com o DNA, podendo causar modificações em sua estrutura (SAMBANDAN; RATNER, 2011), as quais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de processos carcinogênicos (LIN *et al.*, 2005). Além disso, estudos apontam a indução de formação do 8-OHdG (8-hidroxiguanosina) após a exposição a UVB, identificando danos oxidativos (FIGUEIREDO, 2016; GRIFFITHS *et al.*, 1998) que, além de danificar o DNA, podem atingir a membrana celular, gerando falhas na permeabilidade seletiva, podendo levar a célula à morte (FIGUEIREDO, 2016).

As células da pele são as mais expostas a agentes físicos, por isso, estudos em que estas foram expostas a altas doses de radiação UVB, mostram que cerca de 90% das células apresentaram características morfológicas de apoptose até 24 h após a exposição, onde um dos principais indutores dessa foi o estresse oxidativo (GRIFFITHS *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2022).

Em casos de lesões no DNA por exposição à radiação, o gene supressor tumoral p53 é ativado, levando assim à transcrição de sua proteína, a qual impede a proliferação de células com DNA mutado (FETT-CONT; SALLES, 2002). Baixas doses de radiação UVB induzem o DNA ao reparo pela p53, porém, esse mesmo tipo de radiação afeta a localização da proteína, fazendo com que ela não encontre o erro a ser reparado no material genético. Nos estudos realizados, 74% da pele normal exposta ao sol apresentou a p53 mutada enquanto apenas 5% da pele não exposta apresentou a mesma mutação. A mudança gerada nesse gene pode levar à fixação das mutações, por não haver o reparo correto e nem a morte programada de células defeituosas, acarretando assim no desenvolvimento de processos carcinogênicos (GRIFFITHS *et al.*, 1998). Além disso, as formas mutadas da p53 interagem com as proteínas não mutadas impedindo a supressão tumoral (IMAMURA; MIYOSHI; KOEFFLER, 1994).

A combinação de todos os danos causados aos organismos vivos pela exposição aos raios ultravioletas poder ter como resposta: edemas, eritemas, queimaduras solares, imunossupressão, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese (TOSATO *et al.*, 2015). E, ainda, respostas específicas a UVB como a inativação enzimática, inibição da divisão celular, mutagênese e morte celular (SAES, 2016). O sistema imunológico é um dos mais afetados pela exposição à RUV, pois ela possui a capacidade de inibir reações imunes. Esse tipo de reação acaba gerando como resposta o desencadeamento de câncer de pele (FIGUEIREDO, 2016).

O câncer de pele é o tumor com maior incidência no Brasil, sendo responsável por 30% dos diagnósticos de tumores malignos no país (INCA, 2021). O primeiro registro de estudo é de 1893, o qual sugeriu que a radiação solar é a principal responsável pelo desenvolvimento desse tipo de câncer, sendo que a radiação UVB é o principal agente etiológico do carcinoma espinocelular e apresentou resultados muito maiores do que a UVA (ultravioleta do tipo A) no desenvolvimento de melanomas em ratos (NOONAN *et al.*, 2012).

A radiação UVB em doses muito altas provoca na pele uma resposta inflamatória aguda conhecida como eritema solar. O eritema cutâneo provocado por essa faixa de radiação é acompanhado de alterações nucleares (DORNELLES, 2001).

A Dose Eritematosa Mínima (DEM) representa a energia necessária para que o mínimo eritema perceptível apareça após a exposição a RUV, sendo que esse limite varia entre os indivíduos. Quanto mais melanina na pele e maior for o consumo de antioxidantes, como licopeno, ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, maior é a DEM, ou seja, maior a resistência do indivíduo à produção de eritemas (ADDOR; CAMARANO; AGELUNE, 2013; COARITI *et al.*, 2017; SCHALKA; REIS, 2011).

3.2 Câmaras de radiação ultravioleta

As câmaras de radiação UV vem sendo utilizadas há algum tempo com a função de esterilização de objetos, principalmente em ambientes hospitalares. O uso desses equipamentos foi intensificado nos últimos anos por conta da pandemia COVID-19 e as infecções hospitalares bacterianas que acompanharam as superlotações do sistema de saúde. Nesses casos são utilizadas lâmpadas no comprimento de onda de 100 a 280 nm (ultravioleta do tipo C - UVC), a qual é capaz de eliminar microrganismos pelo rompimento das membranas plasmáticas (BOIGUES *et al.*, 2021).

Esse tipo de equipamento também é utilizado no setor de alimentos, com finalidade de esterilizar embalagens que terão contato direto com os produtos finais (ALEXANDRE;

FARIA; CARDOSO, 2008). E, também, na desinfecção direta de alguns alimentos, como ovos (CLÍMACO, 2017).

Além disso, a busca por meios menos invasivos para avaliação da fotoprotetores tem levado ao desenvolvimento de métodos de verificação *in vitro*, nos quais são utilizadas células de mamíferos e câmaras com radiação UV controlada para exposição desses bioindicadores (HUPEL; POUPART; AR GALL, 2011).

3.3 Antioxidantes e Vitamina C

O ácido ascórbico, usualmente denominado de vitamina C, é um dos antioxidantes mais utilizados no mundo. Sólido de cor branca cristalina, inodoro e hidrossolúvel é obtido pelos seres humanos através da suplementação por meio dos alimentos e polivitamínicos, pois o gene responsável pela produção da enzima L-gulonolactona, a qual é responsável pela produção da vitamina C nos organismos vivos, perdeu a função nos seres humanos (LIN *et al.*, 2005; MANELA-AZULAY *et al.*, 2003; PADAYATTY; LEVINE, 2016).

O ascorbato é um eficiente sequestrador de oxigênio reativo oriundo de reações oxidativas que ocorrem nos organismos (RAEESSI-BABAHEYDARI; FARHADIAN; SHAREGHI, 2021). É um dos antioxidantes predominantes na pele humana apresentando um elevado potencial fotoprotetor, juntamente com os tocoferóis e betacarotenos (MANGELA; MARTINS, 2021; STEENVOORDEN; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997), atuando na proteção de ambientes aquosos, principalmente o meio intracelular (LIN *et al.*, 2005).

Em estudos com cultura de células, o antioxidante foi capaz de prevenir efeitos genotóxicos e danos oxidativos no DNA causados por exposição à RUV. Além disso, em pesquisas *in vivo* ele mostrou-se capaz de inativar substâncias tóxicas e mutagênicas formadas durante a exposição à RUV, prevenir lesões cutâneas e tumores quando utilizada em terapias dietéticas (FIGUEIREDO, 2016; STEENVOORDEN; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1997). Em outro estudo, mostrou ser eficaz contra queimaduras solares quando aliada a vitamina E, e teve aumento significativo da proteção quando utilizada juntamente com protetores solares convencionais (DARR *et al.*, 1996; MANGELA; MARTINS, 2021). Células de ovários de hamster tiveram a formação de 8OHdG diminuída após a pré-incubação com ascorbato para exposição a RUV (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

3.4 Camu-Camu

A *Myrciaria dubia*, popularmente conhecida como “Camu-Camu” (Figura 1), pertencente à família *Myrtaceae*, e foi identificada pela primeira vez em 1958 por Mc Vaugh. Fruto nativo do norte do Brasil e encontrado também países vizinhos, como Peru, Colômbia e Venezuela, seu arbusto varia de 3 a 8 metros de altura, com muitas ramificações e apresenta uma alta produtividade anual, sendo que cada fruto pesa em média 8 g (CARMO *et al.*, 2019).

Figura 1 - Camu- Camu (*Myrciaria dubia*)



Fonte: Ventura (2018)

Sua produção ainda é baixa por necessitar de áreas alagadas para seu desenvolvimento, contudo já existem diversas pesquisas de melhoramento da semente para que possam ser cultivadas em diferentes climas (AKTER *et al.*, 2011; CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019). Fruto de sabor ácido e amargo, ele é pouco consumido *in natura*, e tem a maior parte de sua produção sob a forma de polpa congelada a qual é exportada para países da Europa, além do Japão e Estados Unidos, onde é transformada em bebidas espumantes, vinagre, sorvete e doces (YUYAMA, 2011). Além disso, ainda existe a produção da celulose desidratada, sendo essa utilizada na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (SANTOS *et al.*, 2022).

O fruto de Camu-Camu tem recebido visibilidade pelo seu alto teor de compostos antioxidantes naturais, com destaque para o ácido ascórbico que pode chegar a um teor de 6 g 100 g⁻¹ do fruto (SANTOS *et al.*, 2022), vitamina E, β -caroteno, antocianina, além de vários compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (FIDELIS *et al.*, 2020). Também é uma boa fonte de minerais como sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, manganês e cobre. Além disso, são encontrados diferentes tipos de aminoácidos, como serina, valina, leucina, glutamato, 4-aminobutanoato, prolina, fenilalanina, treonina, alanina, e ácidos

orgânicos como ácido cítrico, ácido isocítrico e ácido málico (AKTER *et al.*, 2011), assim como, ácidos graxos como o ácido esteárico, ômega 6 e omega 9 (SILVA, 2018).

Estudos feitos com seu suco e extratos derivados da polpa, semente e casca do fruto identificaram atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, possuindo também propriedades hipolipidêmica e hipoglicêmica (FIDELIS *et al.*, 2020). Ainda, apresentou efeitos hepatoprotetores, antígenotóxicos e antiprotozoário (SILVA, 2018). Além de possuir a capacidade de diminuir os marcadores de estresse oxidativo nos indivíduos que fizeram ingestão do seu suco diariamente (SANTOS *et al.*, 2022).

3.5 Extração de compostos

Estima-se que 60% da população mundial utiliza plantas medicinais na medicina tradicional, porém seus compostos bioativos ainda são pouco explorados, o que tem despertado interesse de indústrias farmacêuticas, cosméticas e de toda comunidade científica (NASTIĆ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2022).

A extração é um dos processos mais utilizados para obtenção de compostos bioativos de origem vegetal, a qual vem se desenvolvendo significativamente nos últimos anos com o atrativo de possuir recursos vitais para formulação de aditivos alimentares, novos medicamentos e cosméticos. Os estudos mais recentes buscam métodos para o aumento do rendimento desses compostos, pois eles são encontrados em quantidades muito baixas nas plantas, além do aumento da qualidade do extrato, diminuição do tempo operacional, e meios que possibilitem minimizar o uso de solventes orgânicos, os quais podem trazer prejuízos ao meio ambiente (JHA; SIT, 2022; JURINJAK TUŠEK *et al.*, 2018; MELECHI, 2005).

O rendimento e a qualidade do extrato dependem da eficiência do processo aplicado. Para isso são levados em consideração o tempo, temperatura, pressão, solvente de extração, as propriedades dos compostos presentes na planta e a quantidade presente em cada parte do vegetal (JHA; SIT, 2022).

No processo de extração sólido-líquido comumente são utilizados solventes orgânicos devido à eficiência, facilidade de uso, baixo custo e a alta aplicabilidade. O álcool etílico é um dos solventes mais utilizados pois é miscível em água, consegue dissolver bem compostos polares e apolares além de possuir baixa toxicidade. Outro ponto a ser destacado em solventes alcoólicos é a alta eficiência na extração de compostos fenólicos e bons rendimentos de extrato (VIEIRA *et al.*, 2017).

Para aumentar a qualidade dos extratos vegetais deve-se trabalhar em condições ótimas

de extração, as quais são obtidas por meio de planejamentos experimentais. A otimização de processos de extração é necessária para maximizar a obtenção e concentração de compostos de interesse no produto final. A qualidade de compostos utilizados como antioxidantes pode ser determinada pela avaliação da quantidade de fenóis, flavonoides, da atividade sequestradora de radicais livres (OLIVEIRA, 2014), por meio de análises físico-químicas e de suas atividades biológicas.

3.6 Atividades biológicas em cultura de células

A cultura de células ganhou grande importância no século XIX, quando se descobriu um método de manter as células vivas em ambientes artificiais, ou seja, fora dos organismos de origem. Atualmente, é um dos métodos laboratoriais mais usados na investigação de potenciais agentes citotóxicos e mutagênicos, caracterização de células cancerosas, terapias gênicas, produção de vacinas e no próprio estudo da biologia celular (VERMA; VERMA; SINGH, 2020).

A viabilidade celular é utilizada para avaliar a saúde de determinada cultura de células, sendo um dos parâmetros mais eficazes para averiguação de efeitos citotóxicos de agentes externos que podem comprometer o metabolismo ou ainda levar as células à morte. A determinação do número de células viáveis tem sido muito utilizada para analisar os efeitos carcinogênicos de compostos químicos, efeitos de solventes e concentração de compostos tóxicos (ROGERO *et al.*, 2003; VERMA; VERMA; SINGH, 2020).

Um dos métodos mais utilizados para determinação da viabilidade celular é o ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], proposto por Mosmann (1983). Esse ensaio é amplamente utilizado para verificar a citotoxicidade de um composto por meio da determinação do crescimento, viabilidade e metabolismo celular, com a vantagem de ser um método barato, simples e com aplicabilidade em muitas linhagens celulares. Esse ensaio colorimétrico é baseado na redução do sal amarelo solúvel para o produto de formazam roxo insolúvel. Essa reação é desencadeada por redutases mitocondriais, não mitocondriais e de membrana plasmática de células viáveis, sendo que quanto maior o número de células viáveis mais escura é a colocação do produto de formazam (MOSMANN, 1983; NGA *et al.*, 2020).

Para esse tipo de teste pode-se utilizar células normais as quais são preparadas em laboratório. A linhagem celular LLC-MK2, obtida do epitélio dos rins de *Macaca mulatta*, foi catalogada para uso em laboratório em 1956 e é muito utilizada nesses testes pelo seu fácil cultivo e serem resistentes a agentes tóxicos (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Obtenção do Camu-Camu

O fruto foi obtido comercialmente em loja de produto natural sob a forma de polpa liofilizada.

4.2 Obtenção do extrato

O extrato foi feito de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1 em condições fixas de temperatura, concentração da polpa do fruto e tipo de solvente, baseado nos trabalhos de Carmo *et al.* (2019) e Fidelis *et al.* (2020). O método utilizado foi o delineamento central composto rotacional (DCCR) 2², contendo 2 variáveis independentes (concentração de solvente e tempo de extração) em cinco níveis e triplicata no ponto central.

Foram utilizados 1 g da polpa diluída em 10 mL de solvente, sendo essa uma solução de etanol e água ultrapura, em concentrações de etanol especificadas na Tabela 1. A extração foi feita sob agitação constante em incubadora *shaker* a 45 °C e rotação de 100 rpm, com tempo variando de 20 a 70 minutos, conforme planejamento experimental. Depois, o extrato foi filtrado com auxílio de papel filtro quantitativo disposto em funil de Büchner e de uma bomba a vácuo.

Tabela 1 - Experimentos delineados pelo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2² com duas variáveis independentes

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Tempo (min)	Concentração	Tempo (min)	Concentração Solvente (%)
1	-1	-1	27	29
2	-1	1	27	71
3	1	-1	63	29
4	1	1	63	71
5	-1,41	0	20	50
6	1,41	0	70	50
7	0	-1,41	45	20
8	0	1,41	45	80
9 C	0	0	45	50
10 C	0	0	45	50
11 C	0	0	45	50

Fonte: Autoria Própria (2022)

Como variável resposta foi realizada a quantificação de compostos fenólicos para a identificação dos parâmetros ótimos de extração. Esses parâmetros foram utilizados para produção do extrato final que foi aplicado no tratamento das células. O extrato produzido foi rotaevaporado antes dos testes celulares, para a retirada do etanol.

4.3 Análises físico-químicas e de compostos bioativos

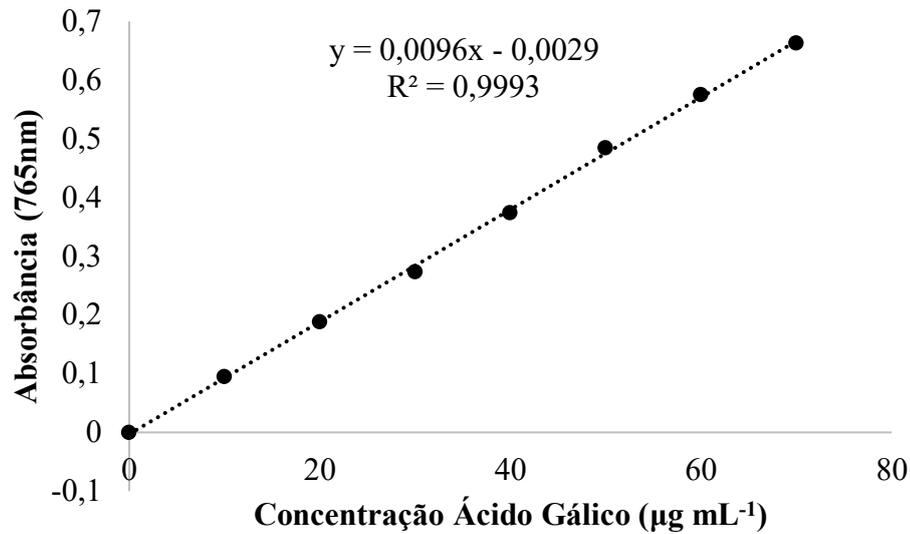
4.3.1 Análise de compostos fenólicos totais

Para determinação do teor de compostos fenólicos no extrato produzido foi utilizado o método proposto pelo ensaio colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), com adaptações.

As amostras dos extratos hidroalcoólicos do Camu-Camu foram previamente diluídas em água Mili Q (1:50). Após, foram adicionados 0,3 mL dessa diluição e 0,7 mL de água Mili Q em tubos de ensaio, que foram misturados com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu puro e 7,5 mL de Mili Q, sendo agitado no vórtex. Depois de 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio saturado a 20%. As amostras permaneceram em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 765 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. A estimativa dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada em triplicata.

Para expressar os resultados, foi usada a curva padrão de ácido gálico (AG) apresentada na Figura 2, com os valores de concentração de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 0,0096x - 0,00029$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra ($\text{mg AG } 100 \text{ g}^{-1}$).

Figura 2 - Curva padrão de ácido gálico para a concentração de compostos fenólicos totais do extrato do Camu-Camu



Fonte: Autoria Própria (2022)

A análise estatística da variável resposta foi realizada pelo teste de variância ANOVA para estimar os parâmetros estatísticos. Os coeficientes do modelo foram analisados pelo teste t de Student a 5% de significância ($p < 0,05$). Além disso, a análise dos resultados foi feita pelo gráfico de Pareto e perfil de resposta.

Após feita toda a análise no planejamento experimental, o ensaio que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, de acordo com o tempo e a concentração de solvente, foi utilizado para as demais avaliações.

4.3.2 Atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante foi utilizada a metodologia do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), modelo descrito por Rufino *et al.* (2007).

Uma amostra do extrato foi diluída em quatro proporções diferentes, como apresentada na Tabela 2. Após, 0,1 mL dessas diluições foram homogêneas com 3,9 mL de solução de DPPH. A absorbância foi medida a 515 nm, em triplicata, após a mistura ter descansado 10 minutos sob abrigo de luz. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se o gráfico de absorbâncias por diluição (mg mL^{-1}) e foi determinada a equação da reta. Para determinar a atividade antioxidante total (AAT) foi substituído a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo y e encontrado o resultado que corresponde a amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH

(EC₅₀).

Tabela 2 - Diluições do extrato de Camu-Camu para a análise da atividade antioxidante

Diluição	Proporção (Extrato:Solvente)	Concentração (mg mL ⁻¹)
1	1:150	7,063
2	1:200	5,271
3	1:250	4,217
4	1:300	3,479

Fonte: Autoria Própria (2022)

4.3.3 Análises físico-químicas

A quantificação de vitamina C do extrato foi feita pelo modelo proposto por Balentine o qual utiliza-se da oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio e pode ser utilizado em amostras com quantidades de ascorbato superiores a 5 mg (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Para a determinação da acidez total e do pH foram utilizadas as metodologias propostas no livro “Métodos físico-químicos para análise de alimentos” (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). As análises foram feitas em triplicata.

4.4 Montagem da câmara de radiação

Para a montagem da câmara de radiação foram feitos testes preliminares tomando como base um revestimento interno de alumínio o qual é um material refletor (RANDIVE, 2016). Foi verificado que esse revestimento possibilitou uma uniformização da intensidade da luz. Os testes também foram realizados para verificar qual dimensionamento da câmara era o mais adequado, observando a distância da placa até a lâmpada e como a distância das paredes interferiam na intensidade da radiação.

A radiação foi fornecida por uma lâmpada com comprimento de onda entre 280 – 315 nm, que compreende a radiação UVB e com 8 W de potência. Para o monitoramento da intensidade de RUV foi montado um circuito com Arduino utilizando o sensor ml8511, responsável por captar ondas na faixa de 280 - 390nm e entrega resultados de leitura em mW cm⁻²

Um esquema do projeto da câmara foi montado e ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Projeto da câmara de radiação



Fonte: Autoria Própria (2022)

4.5 Cultivo das células

As células LLC-MK2, derivadas do rim de *Macaca Mulatta*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli da Universidade Estadual de Londrina, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 10% de soro bovino fetal, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

4.6 Teste de citotoxicidade do MTT

4.6.1 Camu-Camu e radiação UVB

Para verificar a viabilidade celular foi realizado o ensaio do MTT de acordo com o protocolo sugerido (MOSMANN, 1983), com modificações.

2x10⁴ células foram cultivadas por poço, em placas de cultura celular de 96 poços, com 100 µL de meio de cultivo suplementado, por 24 horas. Após estabilização, o meio de cultivo foi descartado e adicionado meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 150 µM -

CO+), tratamentos com o extrato de Camu-Camu nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 μL por mL^{-1} de meio de cultivo.

Para os tratamentos com UVB, após a estabilização, o meio de cultivo foi descartado e foram colocados 20 μL de PBS (tampão fosfato-salino) em cada poço. A placa foi levada para a câmara de radiação e as células receberam diferentes intensidades de radiação (30, 60, 90, 120 e 150 mJ cm^{-2}). Logo após, novo meio de cultivo suplementado foi adicionado aos poços.

Então, as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após cada período, o tratamento foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,167 mg mL^{-1}). As placas foram incubadas por mais quatro horas e o meio com MTT foi substituído por 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 492 nm.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento e a absorbância do controle negativo, de acordo com a equação 1.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{C0-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

ABS_T = Absorbância do tratamento;

ABS_{C0-} = Absorbância do controle negativo.

4.6.2 Citoproteção

Para o teste de citoproteção, foram feitos três tipos de tratamento, sendo eles: pré-tratamento, simultâneo e pós-tratamento (Figura 4).

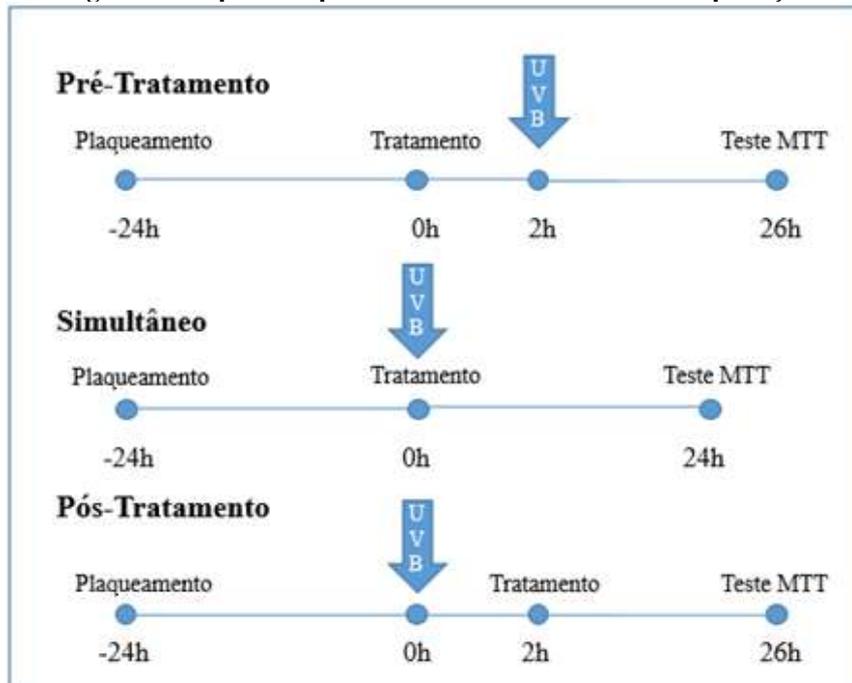
No pré-tratamento, após a estabilização das células, conforme descrito no item 4.6.1, foi colocado o tratamento com extrato de Camu-Camu, nas concentrações de 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de meio de cultivo. Após 2 horas, o tratamento foi retirado e reservado e, foram colocados 20 μL de PBS em cada poço. Então, a placa foi levada para a câmara de radiação onde recebeu uma intensidade de 30 mJ cm^{-2} . Imediatamente depois da exposição o PBS foi descartado e o tratamento com as diferentes concentrações de Camu-Camu foi adicionado novamente aos poços.

No tratamento simultâneo, após a estabilização das células (conforme descrito no item

4.6.1), o meio foi descartado e foram colocados 20 μL de PBS em cada poço. A placa foi levada para a câmara de radiação e as células receberam 30 mJ cm^{-2} de radiação e, logo em seguida, foi adicionado o tratamento com o extrato de Camu-Camu nas mesmas concentrações do pré-tratamento (10, 25, 50 e 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de meio de cultivo).

No pós-tratamento, após a estabilização das células (conforme descrito no item 4.6.1), a placa foi levada para a câmara de radiação e as células receberam 30 mJ cm^{-2} de radiação UVB. Posteriormente a exposição, foi adicionado meio de cultivo suplementado aos poços e as placas permaneceram por 2 horas na estufa de CO_2 . Depois deste período, o meio foi descartado e foi colocado o tratamento com as diferentes concentrações do extrato de Camu-Camu (10, 25, 50 e 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de meio de cultivo).

Figura 4 - Esquema representativo do tratamento de citoproteção



Fonte: Autoria própria (2022)

Depois de 24 horas de incubação após o último tratamento, os tratamentos das placas foram substituídos por meio de cultivo contendo de MTT (0,167 mg mL^{-1}). As placas foram incubadas por mais 4 horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 492 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram apresentados conforme o descrito no item 4.6.1.

4.6.3 Análise estatística

Os valores das absorvâncias foram submetidos ao teste de normalidade, a análise de variância (*one way ANOVA*) e ao teste de comparação de médias de Dunnet ($\alpha = 0,05$), para os teste de citotoxicidade, e de Tukey ($\alpha = 0,05$), para o teste de citoproteção, pelo *software Action Stat*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da condição de extração sólido-líquido do Camu-Camu

As concentrações de compostos fenólicos obtidas pela realização do planejamento experimental (Tabela 3) variaram de 33,89 à 95,07 mg g⁻¹. O ensaio experimental que apresentou o melhor resultado foi o ensaio 5, no qual foi utilizada uma proporção 50% de etanol e um tempo de extração de 20 minutos, indicando assim que um menor tempo de extração é mais eficaz para obtenção dos compostos fenólicos presentes no fruto.

Tabela 3 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio do delineamento experimental com duas variáveis independentes

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente			
	Tempo (min)	Concentração de solvente (%)	Compostos Fenólicos (mg g ⁻¹)			
			1	2	3	Média ± desvio-padrão
1	27,27	28,72	48,07	46,16	47,2	47,14±0,96
2	27,27	71,28	56,93	56,75	55,71	56,46±0,66
3	62,73	28,72	53,98	27,76	23,42	35,05±16,53
4	62,73	71,28	84,7	83,66	85,05	84,47±0,72
5	20	50	94,95	93,39	96,86	95,07±1,74
6	70	50	56,75	53,98	60,75	57,16±3,40
7	45	20	30,89	36,44	34,36	33,89±2,80
8	45	80	34,88	38	34,36	35,75±1,97
9 C	45	50	57,62	64,22	59,01	60,28±3,48
10 C	45	50	71,34	67,17	64,74	67,75±2,34
11 C	45	50	40,95	41,48	40,43	40,95±0,52

Fonte: Autoria Própria (2022)

Em estudo realizado por Fidelis *et al.* (2020) a quantidade média de compostos fenólicos encontrada na semente Camu-Camu foi de 56,09 mg AGE g⁻¹ utilizando uma mistura ternária de propanona, água e álcool etílico (0,666: 0,167: 0,167, v/v). Neves *et al.* (2015) encontraram um total de 109,56 (colheita após 88 dias da maturação da flor) e 127,98 06 mg AGE g⁻¹ (colheita após 100 dias da maturação da flor) na polpa liofilizada do Camu-Camu. Já no estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2020) foi utilizada a extração assistida com ultrassom com 5 minutos de extração a 60 °C e água como solvente, onde foram obtidos 25,8 mg AGE g⁻¹

1.

Esses resultados mostram que além dos parâmetros considerados no planejamento experimental, há outras variáveis que devem ser levadas em consideração para se obter uma maior concentração de compostos fenólicos como a fase de maturação, tipo de solvente e método de extração, visto que houve uma alta variação nos valores obtidos em cada estudo.

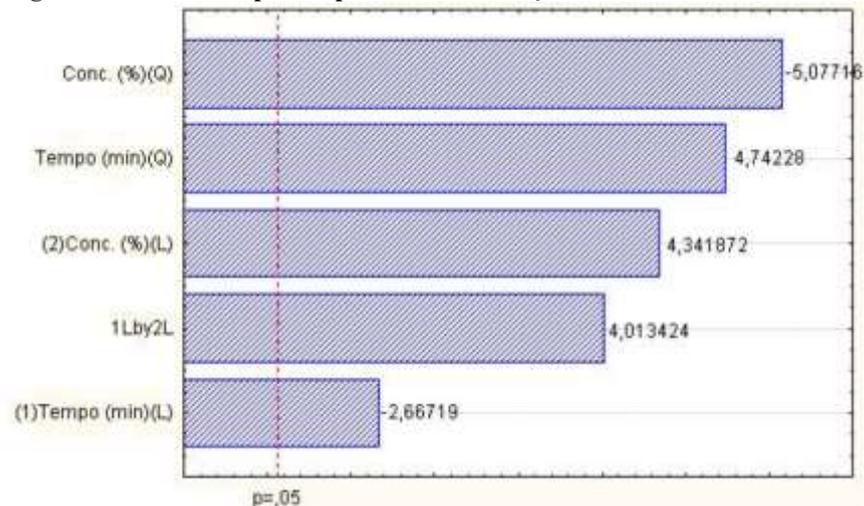
Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA, afim de se obter os parâmetros significativos, principais efeitos e interações e modelos de correlação entre as variáveis experimentais, considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A Tabela 4 apresenta os valores do efeito das variáveis independentes para a determinação do teor de compostos fenólicos e mostra que os fatores tempo e concentração do solvente foram estatisticamente significativas. O Gráfico de Pareto (Figura 5) demonstra visualmente essa afirmação.

Tabela 4 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos totais

Fator	SS	df	MS	F	P
Tempo (q1)	532,74	1	532,745	7,11392	0,013481
Tempo (q1) ²	1684,16	1	1684,165	22,48922	0,00008
Concentração (q2)	1411,77	1	1411,771	18,85186	0,000221
Concentração (q2) ²	1930,42	1	1930,424	25,7776	0,000034
q1 x q2	1206,26	1	1206,258	16,10757	0,000509

Fonte: Autoria Própria (2022)

Figura 5 - Gráfico de pareto para a determinação de fenólicos totais



Fonte: Autoria Própria (2022)

Além disso, os modelos de correlação entre os parâmetros significativos e as variáveis experimentais, tempo de extração e concentração de solvente, foram validados através da análise de variância (ANOVA), sendo os resultados apresentados na Tabela 5. Segundo Neto,

Scarmino e Bruns (2003), o modelo é considerado válido se o fator resultante da análise de ANOVA $F_{\text{calculado}}$ for maior que o fator F_{tabelado} (Tabela F de Fisher - 95% confiança), dando importância aos graus de liberdade referentes aos parâmetros significativos (regressão) e aos resíduos. Assim, pode-se dizer que o modelo em estudo é válido, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ foi de 11,34, sendo este maior que o F_{tabelado} que foi de 2,57, para um nível de significância de 95% (Tabela 5).

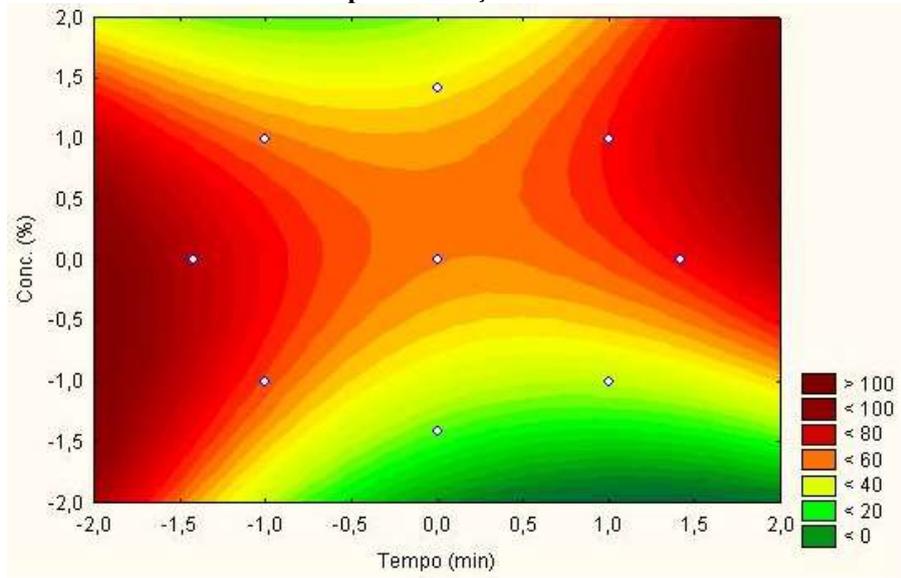
Tabela 5 - Análise de variância do modelo de concentrações de compostos fenólicos obtidos pelo delineamento experimental de extração sólido-líquido do Camu-Camu

Fator	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	F(calculado)	F(tabelado)	P
Regressão	10066	5	2013,21	11,34	2,57	<0,05
Resíduo	4791,33	27	177,46			
Total	13060,1	32	408,18			

Fonte: Autoria Própria (2022)

Os resultados são apresentados ainda em termos do perfil de resposta (Figura 6), em que a análise das variáveis operacionais é realizada em duas dimensões, também chamado de gráfico de contorno com as curvas de níveis. De maneira geral, pela análise feita no perfil de resposta pode-se concluir que as melhores concentrações de compostos fenólicos são obtidas com concentrações de solvente próximo a 50% (1:1 etanol e água) nos menores e maiores tempos de extração. Desta forma, optou-se por realizar a extração final com tempo de 20 minutos e uma concentração de 50% de solvente, coincidindo com o ensaio 5 que resultou nos maiores teores de compostos fenólicos (Tabela 3).

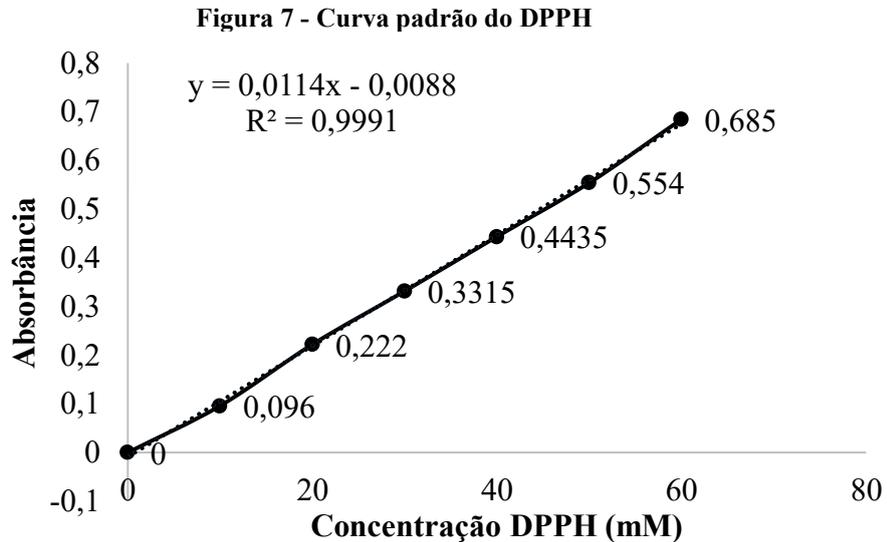
Figura 6 - Perfil de resposta para a concentração de compostos fenólicos em função da temperatura e tempo de extração



Fonte: Aatoria Própria (2022)

5.2 Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi construída a curva padrão do DPPH, que apresentou um $R^2 = 0,9991$, conforme apresentado na Figura 7.



Fonte: Aatoria Própria (2022)

Os resultados encontrados para cada diluição da amostra do extrato final foram expressos em porcentagem de inibição ou captura do radical DPPH, conforme a Tabela 6.

Assim, a atividade antioxidante total do extrato hidroalcoólico do Camu-Camu apresentou EC_{50} igual a $100 \pm 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Solis *et al.* (2009) obtiveram uma EC_{50} com valor igual a $167,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato da polpa utilizando metanol como solvente e concentrações de 10 a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Doroteo *et al.* (2012) encontraram um valor de $EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato hidroalcoólico extraído a partir do Camu-Camu seco e moído, processado em temperatura ambiente por 4 dias, utilizando diluições do extrato entre 0 e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já Silva *et al.* (2012) encontraram um valor de EC_{50} de $116,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ no suco diluído do fruto em concentrações de 2,5 a $275 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 6 - Atividade antioxidante das diluições do extrato final de Camu-Camu

Ensaio	Diluição	Concentração (mg mL ⁻¹)	Inibição (%)
1	1:150	7,063	68,615
2	1:200	5,271	45,931
3	1:250	4,217	36,320
4	1:300	3,479	30,087

Fonte: Autoria Própria (2022)

5.3 Características físico-químicas do extrato do Camu-Camu

Percebe-se pelo valor de pH que o extrato possui característica ácida ($2,94 \pm 0,4$). Prado *et al.* (2020) mostraram índices de pH semelhantes ao encontrado nesse estudo, a polpa congelada de Camu-Camu apresentou pH de $2,93 \pm 0,01$. Sousa *et al.* (2014) analisaram a polpa de diferentes genótipos de Camu-Camu e encontraram pH variando entre 2,53 e 3,14. Inclusive, possivelmente, a característica ácida do fruto explica o baixo consumo *in natura*.

A acidez total encontrada foi de $10,68 \pm 0,16\%$ e, pela conversão a porcentagem de ácido cítrico na amostra foi de $0,748\%$. Barreto *et al.* (2013) encontraram $1,91\%$ em ácido cítrico na polpa do Camu-Camu. Infante (2008) encontrou $1,71\%$ de ácido cítrico, na polpa integral do fruto. Os valores encontrados possuem significativas diferenças que podem ser em decorrência do nível de maturação dos frutos, condições ambientais onde esses foram cultivados e ainda o processo de extração.

Na análise da vitamina C o extrato da polpa de Camu-Camu apresentou como resultado $3.504,788 \pm 63,5 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de extrato. Esse resultado varia de acordo com as partes do fruto utilizadas na análise e também com a maturação. Rufino *et al.* (2010) obtiveram $1.882 \pm 43,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ do fruto fresco de Camu-Camu. Yuyama *et al.* (2002) observaram $6.112 \pm 137,5 \text{ mg}$ de ácido ascórbico em 100 g da polpa do fruto. Já Nascimento *et al.* (2013) encontraram um

resultado menor, $861,73 \pm 64,13$ mg de vitamina C 100 g^{-1} do fruto.

5.4 Câmara de radiação

Com base nos testes preliminares foi observado que as dimensões que apresentaram valores mais uniformes de intensidade de radiação foram 35 x 10 x 40 cm (profundidade x largura x altura) (Figura 8). O sensor foi posicionado no fundo da câmara e foi necessário fazer um ajuste dos valores de radiação pois a placa com as células foi posicionada a uma distância de 15 cm do fundo, região que apresentou menor variação (4%) das leituras de intensidade feitas em triplicata.

Além disso, a programação do sistema com Arduino foi feita para poder controlar a quantidade de radiação através da quantidade de energia ou ainda pelo tempo de exposição.

Figura 8 - Câmara de radiação



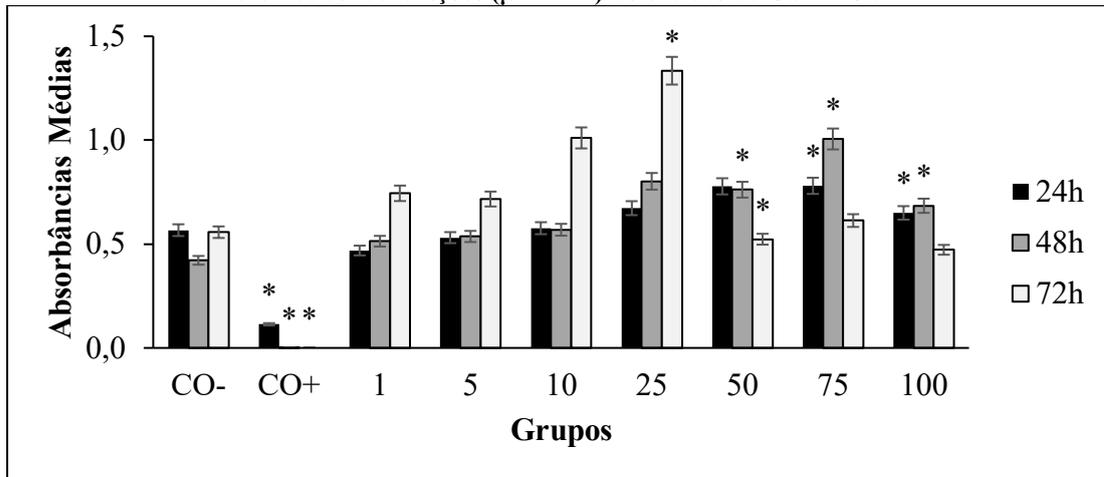
Fonte: Autoria Própria (2022)

5.5 Teste de citotoxicidade

Os dados da Figura 9 apresentam os valores médios de absorvância e seus respectivos desvios padrão obtidos com células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2) tratadas com

diferentes concentrações de extrato do Camu-Camu, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados mostram que nenhuma das concentrações do extrato foi citotóxica para esta linhagem celular. Além disso, a concentração de $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ (72h), $25 \mu\text{L mL}^{-1}$ (48 e 72h), $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ (24 e 48h) e $75 \mu\text{L mL}^{-1}$ (24 e 48h) apresentaram absorvâncias médias estatisticamente maiores que as do controle negativo, o que indica um estímulo da divisão celular nessas concentrações e tempos. Este resultado também pode ser observado na Tabela 7 de viabilidade celular.

Figura 9 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato de Camu-Camu



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2022).

Tabela 7 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	LLC-MK2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	20,05	0,32	0,00
1	82,71	121,82	133,60
5	93,65	127,25	128,67
10	101,68	134,91	181,48
25	118,67	190,23	239,56
50	137,22	180,62	93,93
75	137,65	238,56	110,05
100	114,67	162,30	84,78

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Fonte: Autoria Própria (2022)

Estudos com outras linhagens celulares também confirmaram a indução da divisão

celular com o uso do extrato do fruto de Camu-Camu. Carmo *et al.* (2019) identificaram a proliferação de células de fibroblastos pulmonares não cancerosos (IMR90) quando tratadas com extrato hidroalcoólico da semente do Camu Camu e ainda a citotoxicidade do extrato em células tumorais, resultado que comprovou o potencial quimiopreventivo dos polifenóis presentes no fruto inibindo somente o crescimento de células cancerígenas.

Em estudo com células tronco, Wang *et al.* (2014) mostraram que a vitamina C está diretamente associada com o crescimento e multiplicação celular, pois reduz os efeitos apoptóticos desencadeados por radicais livres. Manela-Azulay *et al.* (2003) também identificaram a indução da proliferação de fibroblastos causada pela ingestão de ácido ascórbico em indivíduos com idade mais avançada, onde esse tipo de célula acaba tendo uma capacidade reprodutiva reduzida. Assim, considerando os elevados teores de vitamina C no extrato do presente estudo, este pode ter conduzido a proliferação das células normais aqui estudadas.

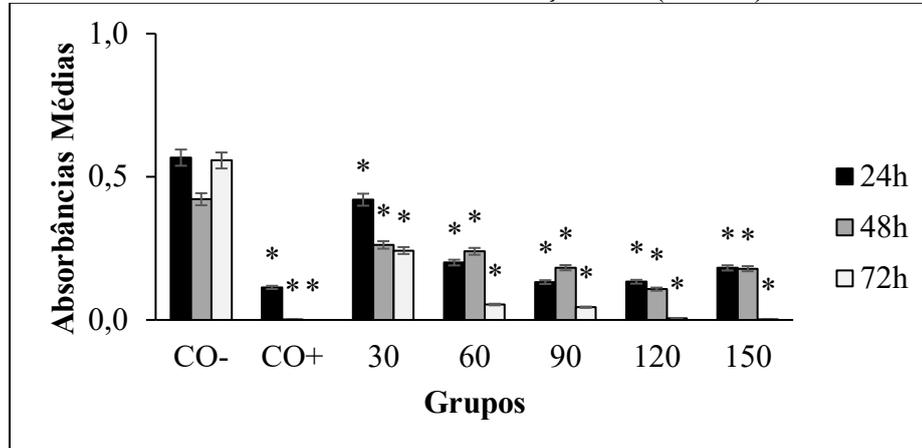
Os dados da Figura 10 apresentam os valores médios de absorvância e seus respectivos desvios padrão obtidos com células normais LLC-MK2 tratadas com diferentes intensidades de radiação UVB, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados mostram que todas as intensidades de radiação testadas foram citotóxicas para essa linhagem celular, nos três tempos de avaliação, confirmando o efeito maléfico deste tipo de radiação para as células normais. Inclusive, as viabilidades celulares atingiram valores mínimos de 23,33% (24 horas), 25,50% (48 horas) e 0,52% (72 horas) (Tabela 8). Pode-se observar que no tempo de 48 horas as células tiveram um aumento da viabilidade celular se comparado ao tempo de 24 horas, para todas as concentrações avaliadas. Entretanto, isso não foi mantido no tempo de 72 horas, tempo em que o efeito citotóxico foi mais evidente para todas as concentrações de UVB testadas.

A radiação ultravioleta induz à formação excessiva de radicais livres, os quais são responsáveis por gerar vários danos celulares, degeneração das fibras de colágeno e contribuem para o envelhecimento da pele, podendo causar estresse oxidativo, inflamações celulares e danos ao DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Todos estes eventos podem ter sido responsáveis pela citotoxicidade da UVB do presente estudo.

A morte celular induzida pela radiação também foi verificada por Fruet (2015), utilizando a linhagem celular HACAT (queratinócitos humanos) e fibroblasto humano primário dermal (FHPD). Neste caso, foi verificada a citotoxicidade a partir de 24 mJ cm⁻² de radiação do tipo UVB através da diminuição da viabilidade celular dos queratinócitos e, a dose de 16 mJ cm⁻² causou a mortalidade de 70% das células FHPD, resultados observados após 24 horas de exposição à radiação. Fagundes (2016) também identificou a citotoxicidade da radiação UVB em testes feitos com células tronco mesenquimais derivadas da pele, as quais foram irradiadas

com diversas doses e obtiveram como resultado uma diminuição da viabilidade celular em mais de 50% para uma dose de 30mJ cm⁻².

Figura 10 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes intensidades de radiação UVB (mJ cm⁻²)



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, p<0,05).

Fonte: Autoria Própria (2022).

Tabela 8 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2, tratadas diferentes intensidades de radiação (mJ cm⁻²) por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	LLC-MK2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	20,05	0,32	0,00
30	74,10	74,51	43,54
60	35,36	56,84	9,67
90	23,33	43,26	7,99
120	23,55	25,50	1,17
150	32,09	42,46	0,52

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Fonte: Autoria Própria (2022)

Em cada estudo foi observado que doses parecidas de radiação UVB atuam de maneiras diferentes em cada linguagem celular, isso pode ser explicado por vários fatores, pois, cada linhagem apresenta um nível de resistência diferente para a RUV. Além disso, os estudos não especificam os comprimentos de onda utilizados para irradiar as células, fato que também pode contribuir para a diferença dos resultados (GIANGRECO *et al.*, 2008; STERN; BICKENBACH, 2007).

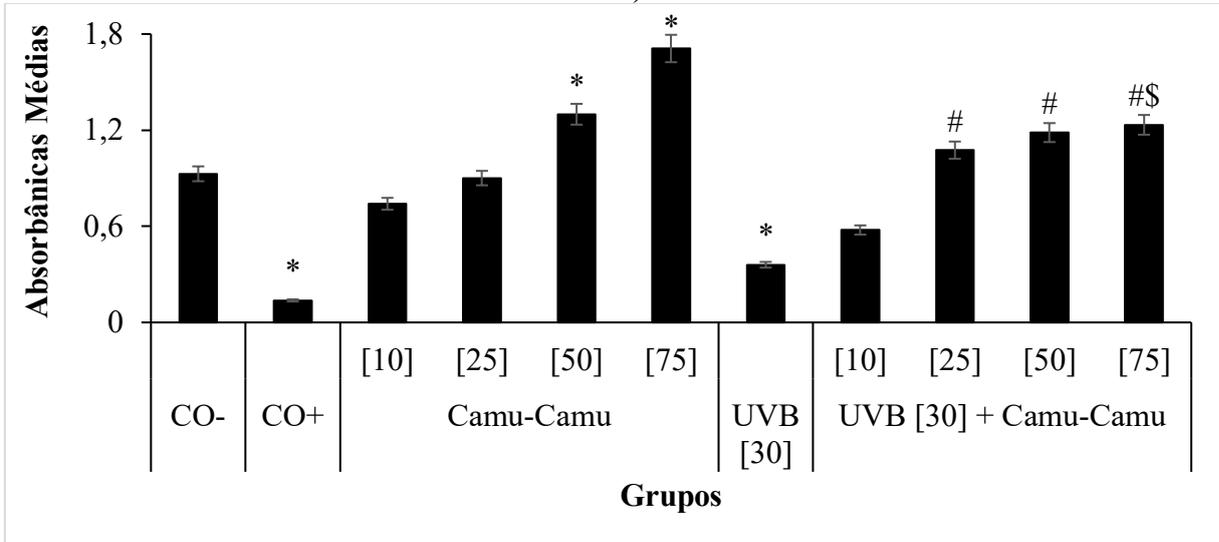
Estudos feitos considerando a classificação seguida por Fitzpatrick demonstraram que uma exposição ao sol do meio-dia (latitude 20° a 40°) por 45 a 90 minutos equivalem a uma dose de 30 mJ cm⁻² (SCHALKA, 2009). Além disso em um estudo feito para determinar a dose eritematosa mínima (DEM) avaliando o efeito da radiação em diferentes fototipos de pele foi possível observar que a partir de 13 mJ cm⁻² já houve a formação de eritemas em indivíduos com a pele mais clara (DORNELLES, 2001).

5.6 Testes de citoproteção

Considerando que todas as doses de radiação apresentaram efeitos citotóxicos, mas que viabilidades celulares muito baixas não possibilitariam a realização de alguns testes biológicos, foi escolhida a menor dose de UVB (30 mJ cm⁻²) para os testes de citoproteção. E, a fim de verificar o efeito do extrato de Camu-Camu como citoprotetor foram testadas as concentrações de 10, 25, 50 e 75 µL mL⁻¹, concentrações estas não foram citotóxicas e que nas duas maiores doses promoveram o estímulo das divisões celulares, no tempo de 24 horas.

Os dados da Figura 11 apresentam os valores médios de absorbâncias e seus respectivos desvios padrão obtidos com células normais de rim de *Macaca mullata* pré-tratadas com o extrato de Camu-Camu, anteriormente à exposição à radiação. Os dados mostram que o pré-tratamento das células com as concentrações de Camu-Camu foram capazes de proteger as células da citotoxicidade causada pela radiação, pois as absorbâncias destes tratamentos (Camu-Camu + radiação) foram estatisticamente semelhantes a absorbância do controle negativo, com viabilidades celulares acima de 62% (Tabela 9). Inclusive, as absorbâncias dos tratamentos com as concentrações de 25, 50 e 75 µL mL⁻¹ de Camu-Camu foram estatisticamente maiores e diferentes da absorbância do tratamento realizado somente a radiação UVB, que apresentou viabilidade celular de 38,79%. E, a comparação de cada concentração do extrato de Camu-Camu sozinho e juntamente com a radiação (Camu-Camu + radiação) foi estatisticamente semelhante para quase todas as concentrações (10, 25 e 50 µL mL⁻¹), indicando que os compostos presentes no extrato foram capazes de reverter os efeitos maléficos da radiação.

Figura 11 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao pré-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu antes da exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2})



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo. # Resultado estatisticamente diferente do tratamento com a UVB [30]. \$ Resultado estatisticamente significativo a mesma concentração do tratamento somente com Camu-Camu. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2022)

Tabela 9 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao pré-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu antes da exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2})

Grupos	LLC-MK2
	VC [%]
	24 h
CO-	100,00
CO+	14,80
10	79,81
25	97,11
50	140,05
75	184,28
UVB	38,79
UVB + [10]	62,20
UVB + [25]	115,90
UVB + [50]	127,72
UVB + [75]	132,94

Fonte: Autoria Própria (2022)

Doroteo *et al.* (2012) também realizaram experimentos de fotoproteção utilizando um extrato hidroalcoólico do Camu-Camu ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), onde fibroblastos (BALB/c 3T3) foram pré-tratamentos durante 4 horas e expostos à uma lâmpada com o comprimento de onda de 312 nm (UVB) por 90 segundos. Através do ensaio do MTT, obteve como resultado uma

fotoproteção de 43,6%.

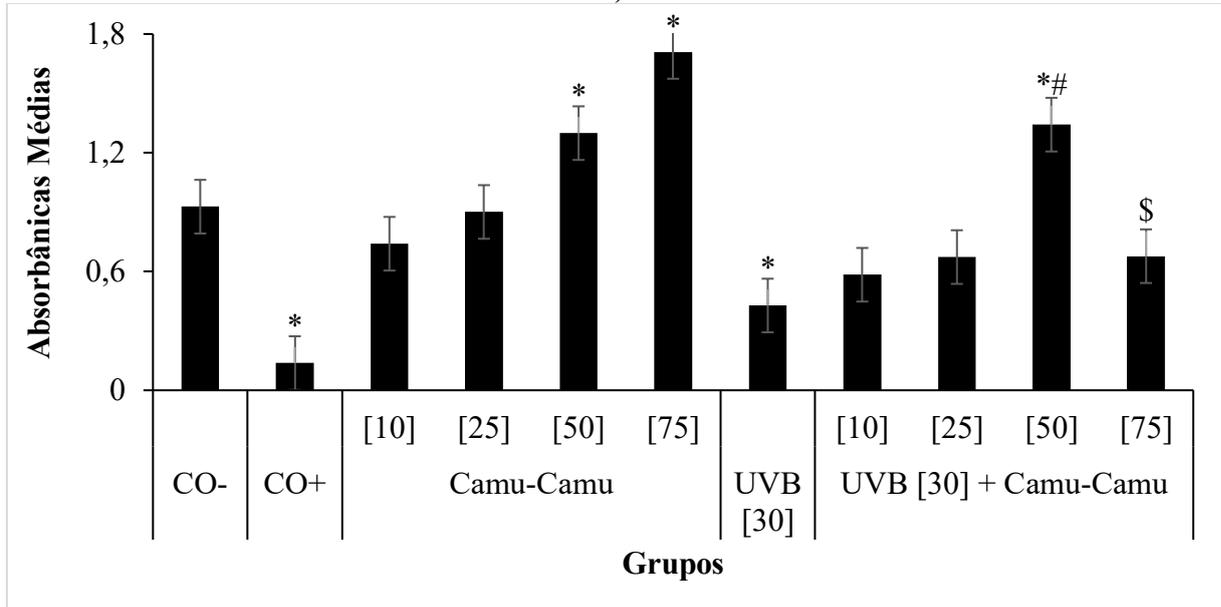
Estudos mostraram que os compostos fenólicos e a vitamina C atuam na fotoproteção através de vários mecanismos como: diminuindo a formação de oxigênio reativo, amenizando assim o estresse oxidativo, atuam como anti-inflamatórios, além de auxiliarem no sistema imunológico, promovendo o aumento da dose eritematosa mínima (ADDOR; CAMARANO; AGELUNE, 2013; EBERLEIN-KONIG; PLACZEK; PRZYBILLA, 1998; PINNELL, 2003). Além disso, o ácido ascórbico promove a proteção das células atuando em meio aquoso, auxiliando na formação do colágeno e ainda regenerando a vitamina E, a qual é responsável por proteger estruturas lipídicas como a membrana celular (LIN *et al.*, 2003). Estes eventos podem ter sido responsáveis pela fotoproteção do Camu-Camu no pré-tratamento do presente estudo.

Os dados da Figura 12 apresentam os valores médios de absorbância e seus respectivos desvios padrão obtidos com células LLC-MK2 submetidas ao tratamento simultâneo de Camu-Camu e radiação. Os dados mostram que o tratamento simultâneo também foi capaz de proteger ou reverter o efeito citotóxico da radiação sobre as células do presente estudo, pois estes tratamentos (Camu-Camu + radiação) foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo, com viabilidades celulares também acima de 62% (Tabela 10).

Além disso, o tratamento simultâneo da radiação com a concentração de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi estatisticamente diferente do controle negativo e do tratamento realizado somente a radiação UVB, pois, assim como tratamento com esta concentração de Camu-Camu sozinha, resultou em proliferação celular, com viabilidade celular de 144,66% (Tabela 10). Assim como no pré-tratamento, somente o tratamento simultâneo da concentração de 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não foi semelhante ao tratamento com a mesma concentração do extrato sozinho.

De acordo com estudos, a proteção fornecida pelas vitaminas e compostos fenólicos, quando utilizados em pré-tratamento e tratamento simultâneo, como no presente estudo, ocorre devido ao potencial de induzir o aumento da síntese de colágeno e DNA, além de protegerem as células neutralizando os radicais livres (GETOFF, 2001; JAGETIA *et al.*, 2007).

Figura 12 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao tratamento simultâneo com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu e a radiação UVB (mJ cm^{-2})



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo. # Resultado estatisticamente diferente do tratamento com a UVB [30]. \$ Resultado estatisticamente significativo a mesma concentração do tratamento somente com Camu Camu. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2022)

Tabela 10 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao tratamento simultâneo com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu e a radiação UVB (mJ cm^{-2})

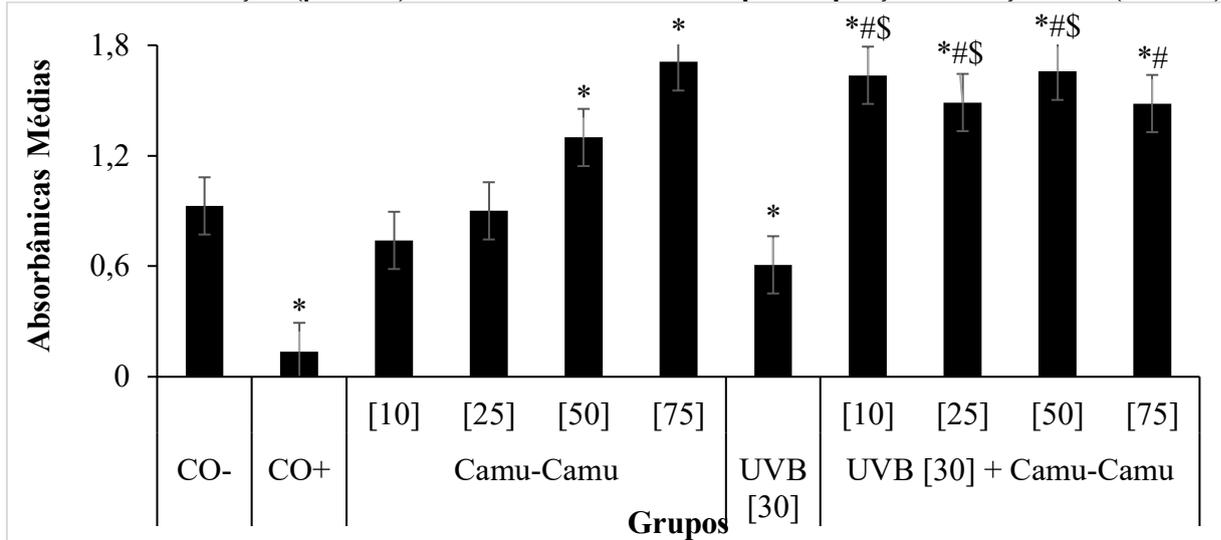
Grupos	LLC-MK2
	VC [%]
	24 h
CO-	100,00
CO+	14,80
10	79,81
25	97,11
50	140,05
75	184,28
UVB	46,16
UVB + [10]	62,91
UVB + [25]	72,55
UVB + [50]	144,66
UVB + [75]	73,03

Fonte: Autoria Própria (2022)

Os dados da Figura 13 apresentam os valores médios de absorbância e seus respectivos desvios padrão obtidos com células normais pós-tratadas com o extrato de Camu-Camu. Os dados mostram que o Camu-Camu foi capaz de reverter o efeito citotóxico causado pela

radiação, pois, todas as concentrações de Camu-Camu testadas no pós-tratamento foram estatisticamente diferentes do controle negativo, do tratamento com a radiação sozinha e do tratamento com o Camu-Camu sozinho (exceto para a concentração de $75 \mu\text{L mL}^{-1}$), induzindo a proliferação celular com viabilidades celulares maiores que 159% (Tabela 11).

Figura 13 - Absorbância média e desvio-padrão das células LLC-MK2 submetidas ao pós-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu após a exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2})



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo. # Resultado estatisticamente diferente do tratamento com a UVB [30]. \\$ Resultado estatisticamente significativo a mesma concentração do tratamento somente com Camu-Camu. (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2022)

Tabela 11 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais LLC-MK2 submetidas ao pós-tratamento com diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato do Camu-Camu após a exposição à radiação UVB (mJ cm^{-2})

Grupos	LLC-MK2
	VC [%]
	24 h
CO-	100,00
CO+	14,80
10	79,81
25	97,11
50	140,05
75	184,28
UVB	65,51
UVB + [10]	176,46
UVB + [25]	160,53
UVB + [50]	178,80
UVB + [75]	159,91

Fonte: Autoria Própria (2022)

Fruet (2015) também demonstrou a atividade quimiofotoprotetora de compostos fenólicos em testes utilizando radiação UVA e UVB em queratinócitos humanos, tanto em pré-tratamento quanto em pós-tratamento. Darr *et al.* (1996) identificaram que a vitamina C é capaz de absorver comprimentos de onda na região UVB, sendo capaz de diminuir os danos fototóxicos e mostrando aumento da fotoproteção de protetores solares tópicos quando combinados com o ácido ascórbico. De acordo com os estudos, no pós-tratamento, as vitaminas e compostos fenólicos atuam fazendo o reparo dos danos gerados pela RUV (GETOFF, 2001; JAGETIA *et al.*, 2007).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou resultados satisfatórios de extração de compostos fenólicos e vitamina C do Camu-Camu em uma temperatura de 45 °C, com 20 minutos de extração e uma concentração de 1:1 de álcool etílico e água, os quais foram similares aos encontrados em outros estudos.

As dimensões utilizadas na construção da câmara de radiação juntamente com o revestimento de alumínio foram capazes de promover uma uniformização da intensidade de radiação na posição central do equipamento.

Nos ensaios realizados, demonstrou-se que o extrato do fruto não foi citotóxico para a linhagem celular normal LLC-MK2 em nenhuma das concentrações aplicadas e, ainda, que as células foram sensíveis as intensidades de radiação utilizadas. Além disso foi possível observar que o extrato do Camu-Camu possui atividade fotoprotetora e ainda auxiliou na proliferação das células normais após a exposição à radiação UVB.

Assim, os dados do estudo indicam que os compostos bioativos encontrados no Camu-Camu têm o potencial de auxiliar no aumento da fotoproteção e ainda de minimizar os danos causados pela radiação ultravioleta. Bem como, mostraram que é possível fazer a investigação do potencial fotoprotetor *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ADDOR, F. A. S. A.; CAMARANO, P.; AGELUNE, C. Aumento da dose eritematosa mínima a partir da ingestão de um suplemento vitamínico contendo antioxidantes. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, 2013. v. 5, n. 3, p. 212–215.
- AKTER, M. S. *et al.* Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, ago. 2011. v. 44, n. 7, p. 1728–1732. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911002043>>.
- ALEXANDRE, F.A.; FARIA, J. A. F.; CARDOSO, C. F. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. **Ciênc. agrotec.**, 2008. v. 32, n. 5, p. 1524–1530.
- ANDREO, D.; JORGE, N. ANTIOXIDANTES NATURAIS: TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 31 dez. 2006. v. 24, n. 2, p. 319–336. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/7489>>.
- ARELLANO-ACUÑA, E.; ROJAS-ZAVALETA, I.; PAUCAR-MENACHO, L. Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Tropical fruit of excellent functional properties that help to improve the quality of life. **Scientia Agropecuaria**, 31 dez. 2016. v. 7, p. 433–443. Disponível em: <<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1266>>
- BARRETO, A. G. *et al.* Clarificação de polpa de camu-camu por microfiltração. **Brazilian Journal of Food Technology**, set. 2013. v. 16, n. 3, p. 207–215. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232013000300006&lng=pt&tlng=pt>.
- BOIGUES, G. S. *et al.* PROTÓTIPO DE UMA CAMARA DE RADIAÇÃO UV-C PARA DESINFECÇÃO DE OBJETOS. **COLLOQUIUM EXACTARUM**, 23 fev. 2021. v. 12, n. 4, p. 71–81. Disponível em: <<http://journal.unoeste.br/index.php/ce/article/view/3837/320>>.
- CAMPONOGARA, C.; OLIVEIRA, S. M. Are TRPA1 and TRPV1 channel-mediated signalling cascades involved in UVB radiation-induced sunburn? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 1 maio. 2022. v. 92, p. 103836.
- CARMO, M. A. V. Do *et al.* Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, nov. 2019. v. 125, p. 108551. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919304296>>.
- CLÍMACO, W. L. S. **Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis**. 2017. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2017.
- COARITI, J. R. *et al.* Ultraviolet solar radiation and photodermatoses in La Paz - Bolívia. **Revista Brasileira de Geografia Física**, 2017. v. 10, n. 2. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-2295.20170022>>.

CUNHA-SANTOS, E. C. E. et al. Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. **Food Research International**, 1 jan. 2019. v. 115, p. 160–166. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918306379>>. Acesso em: 19 out. 2021.

DAFRE, A. L.; MARIS, A. F. Efeitos biológicos das radiações. 1ª ed. e 2ª reimp. - Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2013. 35-53p.

DARR, D. et al. Effectiveness of antioxidants (Vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. **Acta Derm Vcnereol (Stockh)**, 1996. v. 76, p. 264–268.

DORNELLES, S. I. T. **Determinação da dose eritematosa mínima como marcador de risco e sensibilidade à radiação ultravioleta**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

DOROTEO, V. H. et al. Compuestos fenólicos y actividades antioxidante, antielastasa, anticologenasa y fotoprotectora in vitro de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Caesalpinia spinosa* (tara). **Rev. Soc. Quím. Perú**, out. 2012.v. 78, n. 4, p. 254-263. Disponível em: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000400005&lng=es&nrm=iso>.

EBERLEIN-KÖNIG, B.; PLACZEK, M.; PRZYBILLA, B. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- α -tocopherol (vitamin E). **Journal of the American Academy of Dermatology**, jan. 1998. v. 38, n. 1, p. 45–48. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962298705377>>.

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods [3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity assay] DB-ALM Protocol n ° 78 Phototoxicity Objective & Application Résumé Data Analysis / Prediction Model. 2008. p. 1–19.

FAGUNDES, A. C. **Efeito da radiação ultravioleta B em células tronco mesenquimais derivadas da pele**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

FETT-CONT, A.; SALLES, A. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2002. v. 24, n. 2, p. 85–89.

FIDELIS, M. et al. Camu-camu seed (*Myrciaria dubia*) - From side stream to antioxidant, antihyperglycemic, antiproliferative, antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient. **Food chemistry**, 25 abr. 2020. v. 310, p. 125909. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619320473>>. Acesso em: 19 set. 2021.

FIGUEIREDO, S. A. **Desenvolvimento e validação de ensaios *in vitro* usando cultura de células imortalizadas e primárias para avaliação da eficácia fotoprotetora de protetores solares empregando como parâmetros de medida as alterações induzidas na pele pelas radiações UVA e UVB**. 2016. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. doi:10.11606/T.60.2017.tde-03022017-145030.

FRUET, A. C. Avaliação do efeito fotoprotetor sobre cultura de células da pele irradiadas por UVA e UVB. 2015. Tese (Doutorado em Insumos Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.9.2015.tde-28052015-083539.

GETOFF, N. Cytostatica efficiency enhancement by vitamins C, E and β -carotene under irradiation. State of the art. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 60, p. 351-358, 2001.

GIANGRECO, A. et al. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. **Aging Cell**, v. 7, n. 2, p. 250–259, 2008.

GRIFFITHS, H. R. et al. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 1998. v. 35, n. 3, p. 189–237.

HULL, R.N.; CHERRY, W.R.; TRITCH, O.J. Growth characteristics of Monkey Kidney Cell Strains LLC-MKT, LLC-MK2, AND LLC-MK~(NCTC-3196) and their utility in virus research. **Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 5, p. 903–918, 1962. doi: 10.1084 / jem.115.5.903

HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, out. 2011. v. 86, p. 362–371. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914011008344>>

IMAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H. p53 in hematologic malignancies. **Blood**, 15 out. 1994. v. 84, n. 8, p. 2412–2421. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/84/8/2412/172805/p53-in-hematologic-malignancies>>.

INFANTE, X. L. B. **Produção e avaliação da qualidade do suco clarificado de Camu-Camu, originário da margem do rio Putumayo (fronteira Brasil – Colômbia)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de câncer. 2021 Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 7 abr. 2022.

JAGETIA, G.C.; RAJANIKANT, G.K.; RAO, K.V.N.M. Ascorbic acid increases healing of excision wounds of mice whole body exposed to different doses of γ -radiation. **Burns**. v. 33, p. 484-494, 2007.

JHA, A. K.; SIT, N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 1

jan. 2022. v. 119, p. 579–591.

JURINJAK TUŠEK, A. et al. Optimizing bioactive compounds extraction from different medicinal plants and prediction through nonlinear and linear models. **Industrial Crops and Products**, 15 dez. 2018. v. 126, p. 449–458. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.040>>. Acesso em: 9 mar. 2022.

LIN, F. H. et al. Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 1 out. 2005. v. 125, n. 4, p. 826–832.

LIN, J.Y. et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **Journal of the American Academy of Dermatology**, jun. 2003. v. 48, n. 6, p. 866–874. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203007813>>.

MANELA-AZULAY, M. et al. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2003. v. 78, n. 3, p. 265–272. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/j/abd/a/hgLDMrqqx63MpNKC8XH5TzG/>>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MANGELA, T.; MARTINS, A. Benefícios da vitamina C na pele. **Enciclopédia Biosfera**, 30 mar. 2021. v. 18, n. 35. Disponível em:

<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2021A/beneficios.pdf>>

MELECHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, dez. 1983. v. 65, n. 1–2, p. 55–63. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>>.

NASCIMENTO, O.V.; BOLETI, A.; YUYAMA, L.K.O.; LIMA, E.S. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. **An Acad Bras Cienc**. 2013. v.85, p.355.

NASTIĆ, N. et al. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, 1 jan. 2018. v. 111, p. 579–589. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.015>>. Acesso em: 9 mar. 2022.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E., **Como fazer experimentos-pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora Unicamp, Campinas. 2ª ed., 339 p., 2003.

NEVES, L. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae**, 21 abr. 2015. v. 186, p. 223–229.

NGA, N. T. H. et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, 1 dez. 2020. v. 610, p. 113937.

NOONAN, F. P. et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature Communications**, 2012. v. 3, n. May, p. 810–884. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1893>.

OCHOA-VELASCO, C. E. *et al.* A sequential method to estimate equilibrium Point and diffusion coefficients of bioactive compounds during solid–liquid extraction. **Food and Bioproducts Processing**, 1 jul. 2019. v. 116, p. 219–226.

OLIVEIRA, A. C. De *et al.* Efeitos do ácido ascórbico no combate ao envelhecimento cutâneo. **BWS Journal**, 2018. v. 1, p. 1–7. Disponível em: <https://bwsjournal.emnuvens.com.br/bwsj/article/view/15>.

OLIVEIRA, G. A. R. Otimização de processos de extração de princípios ativos de plantas. **Revista Processos Químicos**, v. 8, n. 16, p. 33-41, 2014.

PADAYATTY, S.; LEVINE, M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. **Oral Diseases**, set. 2016. v. 22, n. 6, p. 463–493. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12446>>.

PEDERSEN, J. E.; HANSEN, J. Colorectal cancer and occupational exposure to solar ultraviolet B radiation in Denmark. **Environmental Research**, dez. 2022. v. 215, p. 114260. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935122015870>>.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, jan. 2003. v. 48, n. 1, p. 1–22. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203500056>

PRADO, C. K. et al. Camu-Camu (Myrciaria Dubia (H.B.K.) MC Vaughn): Padrão de identidade e qualidade, compostos fenólicos, capacidade redutora e antioxidante da polpa. **Instituto internacional Despertando Vocações**. 2020. Disponível em: <<https://ciagro.institutoidv.org/ciagro/uploads/1874.pdf>>.

RAEESI-BABAHEYDARI, E.; FARHADIAN, S.; SHAREGHI, B. Comparative studies on the interaction of ascorbic acid with gastric enzyme using multispectroscopic and docking methods. **Journal of Molecular Structure**, 5 dez. 2021. v. 1245, p. 131270.

RANDIVE, R. Application Notes AN011 - Using UV Reflective Materials to Maximize Disinfection - Klaran. 2016. Disponível em: <<https://klaran.com/using-uv-reflective-materials-to-maximize-disinfection>>. Acesso em: 1º jun. 2022.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Camu-camu bioactive compounds extraction by ecofriendly sequential processes (ultrasound assisted extraction and reverse osmosis). **Ultrasonics Sonochemistry**, 1 jun. 2020. v. 64, p. 105017.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 3, n. 3, p. 317-320, 2003.

RUFINO, M. Do S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa**, 2007. p. 1–4. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>

RUFINO, M. Do S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, ago. 2010. v. 121, n. 4, p. 996–1002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610001172>>.

SAES, E. Da S. **Uso de protetores solares e risco de câncer de pele: uma revisão sistemática e meta-análise**. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 1 abr. 2011. v. 64, n. 4, p. 748–758.

SANTOS, I. L. et al. Camu-camu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: A review of properties and proposals of products for integral valorization of raw material. **Food Chemistry**, 15 mar. 2022. v. 372, p. 131290. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621022962>>. Acesso em: 19 out. 2021.

SCHALKA, S. **Influência da quantidade aplicada de protetores solares no fator de proteção solar (FPS): avaliação de dois protetores solares com os mesmos ingredientes em diferentes concentrações**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Dos. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, jun. 2011. v. 86, n. 3, p. 507–515. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000300013&lng=pt&tlng=pt>.

SILVA, A. S. **Avaliação da secagem do bagaço de cajá usando planejamento fatorial composto central**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVA, F. C. DA *et al.* Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food and Chemical Toxicology**, 1 jul. 2012. v. 50, n. 7, p. 2275–2281.

SILVA, F. C. DA *et al.* Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. **Food and Chemical Toxicology**, jul. 2012. v. 50, n. 7, p. 2275–2281. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512003055>>.

SILVA, J. T. **O efeito antitumoral do extracto hidroalcoólico do fruto da *Myrciaria dubia* (Kunth) mcvaugh (camu-camu)**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Inovação Tecnológica para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

SILVA, R. F. et al. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. **Microchemical**

- Journal**, 1 abr. 2022. v. 175, p. 107184. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X22000121>>. Acesso em: 9 mar. 2022.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 1999, v. 299, p. 152–178.
- SOLIS V.S.; DOZA L.S.; SOTERO D.G. De; CORREA S.I. Antioxidant activity from pulp, cáscara y semilla del fruto Camu Camu (*Myrciaria dubia* H.B.K.). **Rev la Soc Química del Peru**. 2009. v. 75, p. 293–9.
- SOUSA, S. H. B. de, *et al.* Caracterização físico-química e funcional de diferentes genótipos de Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc VAUGH). **Embrapa**. 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/994264/caracterizacao-fisico-quimica-e-funcional-de-diferentes-genotipos-de-camu-camu-myrciaria-dubia-hbk-mc-vaugh>>
- STEENVOORDEN, D. P. T.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, nov. 1997. v. 41, n. 1–2, p. 1–10. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S101113449700081X>>.
- STERN, M. M; BICKENBACH, J. R. Epidermal stem cells are resistant to cellular aging. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 439–452, 2007.
- TOSATO, M. G. *et al.* Confocal Raman spectroscopy: In vivo biochemical changes in the human skin by topical formulations under UV radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, dez. 2015. v. 153, p. 51–58. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134415002808>>.
- VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. **Animal Biotechnology**, 1 jan. 2020. p. 269. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7325846/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3725846/)>. Acesso em: 9 abr. 2022.
- VIEIRA, V. *et al.* Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. **Industrial Crops and Products**, nov. 2017. v. 107, p. 341–352. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669017303989>>.
- WANG, J. *et al.* Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells *in vitro*. **Theriogenology**, v. 81, p. 545–555, 2014.
- YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, jun. 2011. v. 33, n. 2, p. iii–iv. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000200001&lng=pt&tlng=pt>.
- YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu Camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amaz.** 2002. v. 32, p. 169.
- ZAWROTNIAK, M.; BARTNICKA, D.; RAPALA-KOZIK, M. UVA and UVB radiation

induce the formation of neutrophil extracellular traps by human polymorphonuclear cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 1 jul. 2019. v. 196, p. 111511.

ZHANG, J. *et al.* Dihydroquercetin composite nanofibrous membrane prevents UVA radiation-mediated inflammation, apoptosis and oxidative stress by modulating MAPKs/Nrf2 signaling in human epidermal keratinocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, nov. 2022. v. 155, p. 113727. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332222011167>>.