



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Trabajo Final de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio de moléculas innovadoras obtenidas a partir de biomasa para su aplicación como agentes antioxidantes y protectores frente a la radiación UV

Agustina Sanders Pons

Tutora: Paola Hernández

Cotutora: Victoria de la Sovera

Departamento de Genética

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



Ministerio
de Educación y Cultura



Montevideo, Uruguay

Febrero 2026

Agradecimientos

En primer lugar, manifestar mi eterno agradecimiento a mi madre, mi padre, y mi hermana, por ser mis pilares en la vida y mi sostén durante todos estos años. También quiero agradecer a los que se fueron: a mi abuela, por su aliento y cariño; y a Mili, mi perrita, por alegrar mis días por 15 años hasta la culminación de esta tesis. Mención de honor a mis amigas de la vida por el apoyo mutuo en nuestros diferentes caminos, y a Beto por escucharme siempre. Extiendo mi gratitud a las amistades surgidas en la universidad, quienes han hecho más ligero y entretenido este camino. Gracias a mis tutoras, Paola y Viro, quienes me abrieron las puertas del laboratorio confiando en mí para este proyecto de investigación, por su orientación académica, el conocimiento impartido, y su calidez humana; asimismo agradecer a mi compañera de laboratorio Miriam, que me ha brindado su ayuda, saber y momentos divertidos. Finalmente, a la Facultad de Ciencias, por generar un ambiente ameno en el cual estudiar y desarrollarse, y a la Universidad de la República, pública, gratuita y de calidad.

Contenido

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Radiación UV incidente en la Tierra.....	5
1.2. La piel.....	5
1.3. Efectos nocivos de la radiación UV en la piel.....	7
1.3.1. Efectos a nivel molecular y celular.....	8
1.3.2. Efectos agudos.....	10
1.3.3. Efectos tardíos.....	11
1.4. Prevención en la actualidad.....	12
1.5. En busca de alternativas sustentables.....	13
1.6. Antecedentes del grupo de investigación.....	14
2. Hipótesis y Objetivos.....	16
2.1. Hipótesis.....	16
2.2. Objetivos.....	16
2.2.1 Objetivo general.....	16
2.2.2 Objetivos específicos.....	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1. Reactivos comerciales y compuestos sintetizados.....	17
3.2. Lámpara de luz UVA.....	17
3.3. Análisis UV y fotoestabilidad.....	18
3.4. Actividad antioxidante.....	18
3.4.1. ABTS.....	18
3.4.2. ORAC-FL.....	19
3.5. Cultivo celular.....	20
3.6. Fotoprotección frente a la radiación UVA.....	21
3.6.1. Citotoxicidad de la radiación UVA.....	21
3.6.1.1. MTT.....	21
3.6.1.2. Tinción con naranja de acridina y ioduro de propidio.....	21
3.6.2. Niveles de oxidantes intracelulares.....	23
3.6.3. Daño al ADN.....	24

3.7. Gráficos y estadística.....	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1. Análisis UV y fotoestabilidad.....	26
4.2. Citotoxicidad.....	28
4.2.1. Citotoxicidad de la radiación UVA.....	29
4.3. Actividad antioxidante de los compuestos.....	31
4.4. Evaluación de los niveles de especies oxidantes en el modelo celular.....	35
4.5. Daño al ADN.....	40
5. Conclusiones y perspectivas.....	43
6. Bibliografía.....	45
7. Anexo.....	60

Resumen

La radiación ultravioleta (UV) incidente en la Tierra se compone en un 95% por luz UVA (315-400 nm) y en un 5% por UVB (280-315 nm), mientras que la UVC (100-280 nm) es absorbida por la capa de ozono. Esta radiación es capaz de penetrar en las distintas capas de la piel, generando daño en el ADN de forma directa o indirecta a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A su vez, las ROS generadas pueden dañar otras biomoléculas tales como proteínas y lípidos, perjudicando la integridad y funcionalidad celular y tisular. En conjunto, la exposición provoca fotoenvejecimiento y favorece el desarrollo de cáncer de piel. Una estrategia clave de prevención es la aplicación de filtros solares, de los cuales existen dos tipos: minerales y orgánicos. Los filtros orgánicos suelen tener un origen no renovable, no son totalmente eficientes para proteger frente a la radiación UV, y presentan algunos efectos adversos para la salud humana y ambiental. En este contexto, el tratamiento de la biomasa lignocelulósica se presenta como una fuente renovable de plataformas químicas con gran diversidad funcional que permite el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. En este trabajo se evaluó una quimioteca de 41 compuestos derivados de biomasa y sintetizados en condiciones amigables con el ambiente, con la finalidad de obtener moléculas con potencial fotoprotector frente a la radiación UVA. Se empleó como referencia la avobenzona, filtro UVA derivado del petróleo muy utilizado actualmente en formulaciones de protectores solares. En base a estos estudios, 6 de estos compuestos mostraron absorción en el rango UVA y mantuvieron su fotoestabilidad al ser irradiados en dicho rango de longitudes de onda. Además, no resultaron citotóxicos en cultivos celulares derivados de la piel, y presentaron propiedades fotoprotectoras tales como actividad antioxidante y disminución del daño ocasionado en el ADN. Este proyecto sirve como puntapié para estudios posteriores de fotoprotección e inocuidad en la búsqueda de moléculas *hit* para avanzar hacia el desarrollo de futuros filtros solares eficientes y seguros. Asimismo, se refuerza el potencial que poseen los derivados de biomasa como fuentes de plataformas químicas para el desarrollo de principios activos con acción biológica.

1. Introducción

1.1. Radiación UV incidente en la Tierra

La radiación ultravioleta (UV) emitida por el sol puede clasificarse según la longitud de onda de los fotones emitidos en UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm). La capa de ozono es capaz de absorber las longitudes de onda más cortas, absorbiendo la totalidad de la radiación UVC y de forma parcial la radiación UVB. Es por ello que del total de radiación UV incidente en la Tierra el 95% corresponde a UVA y el 5% restante a UVB. Sin embargo, esta incidencia puede estar sujeta a cambios. Algunas variaciones son regulares, de acuerdo a la estación, hora del día, altitud, y ubicación geográfica (Schuch et al., 2013). Otras se deben a cambios en los componentes atmosféricos, como la nubosidad y la contaminación atmosférica, ambos atenuantes (Rahman & Elmi, 2021), y el afinamiento de la capa de ozono, que permite el pasaje de más radiación UVB (Lucas et al., 2015).

1.2. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Se le adjudican diversos roles: protección al ingreso de patógenos y frente a los efectos nocivos de la luz solar; prevención de la pérdida de agua y ante la penetración de sustancias tóxicas, y excreción de éstas últimas con el sudor; regulación de la temperatura corporal; soporte mecánico; funciones sensoriales, endócrinas e inmunológicas (Gilaberte et al., 2016). Se compone de tres capas principales: la epidermis, la dermis, y la hipodermis (Figura 1).

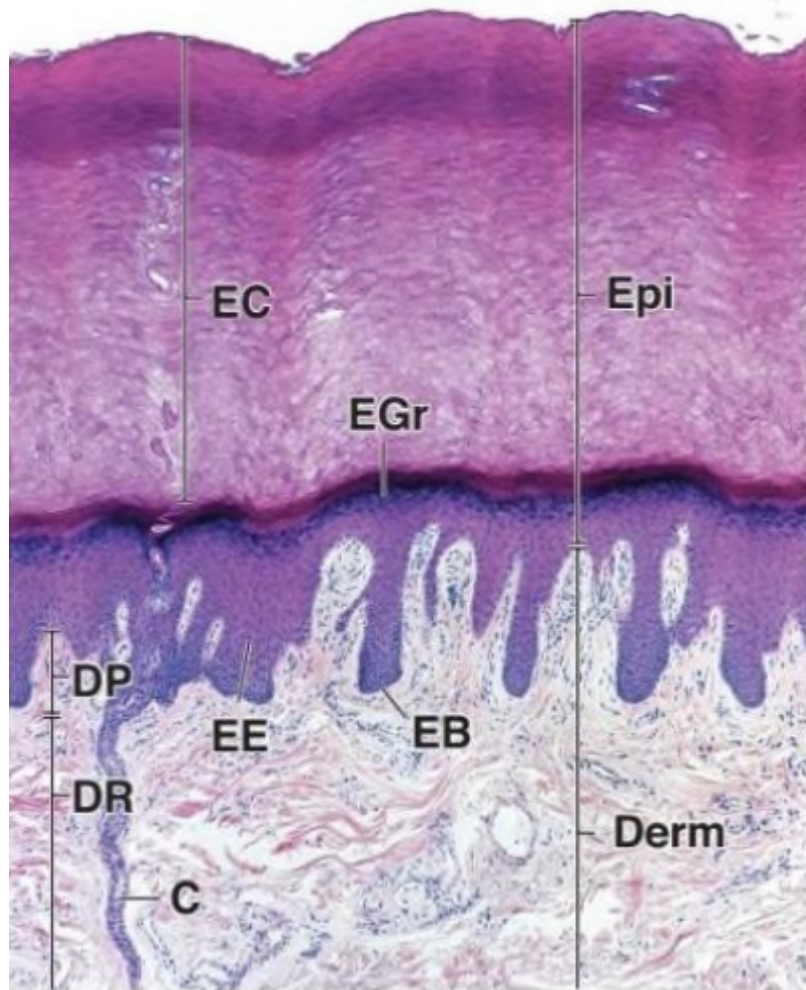


Figura 1. Corte histológico de piel gruesa. La epidermis (Epi) se subdivide en los estratos basal (EB), espinoso (EE), granuloso (EGr) y córneo (EC); no se observa el estrato lúcido. En la dermis (Derm) se reconocen la dermis papilar (DP) y la reticular (DR); se observa el conducto (C) de una glándula sudorípara. Tinción con hematoxilina-eosina, 65X. Imagen tomada de Pawlina & Ross (2020).

La más superficial es la epidermis, en donde el principal componente celular son los queratinocitos, que subdividen a la misma en estratos en función de su estado de diferenciación. El más profundo, el estrato basal, se compone de una sola capa de queratinocitos que proliferan. Las células hijas se diferencian de forma paulatina en los estratos más externos, llegando finalmente al estrato córneo, en contacto con el ambiente. Allí los queratinocitos carecen de viabilidad y adquieren el nombre de corneocitos, son células aplanadas sin núcleo ni organelos citoplasmáticos, con una membrana plasmática

cornificada y una densa red de queratina en su citoplasma. Los corneocitos se encuentran embebidos en una matriz lipídica compuesta por fosfolípidos, esteroides y ceramidas (Lai-Cheong & McGrath, 2017). Es a este último estrato que se le adjudica el rol defensivo de barrera frente a diversos agentes físicos, químicos, biológicos, y frente a la pérdida de agua. La matriz lipídica del estrato córneo es determinante en la permeabilidad de la piel, dado que las células no se encuentran vivas, el pasaje de sustancias a través del mismo depende de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, siendo las características más relevantes el tamaño, la forma, el grado de ionización, y la solubilidad lipídica (Gupta, 2016; Tedesco et al., 2017). Aquellas moléculas capaces de penetrar de forma pasiva dentro de la piel presentan bajo peso molecular y tienen un carácter moderadamente lipofílico (Tedesco et al., 2017).

En el estrato basal también se encuentran melanocitos, células que producen el pigmento melanina, el cual es empaquetado en organelos llamados melanosomas y transportados a los queratinocitos basales vecinos para proteger al núcleo celular bloqueando los rayos UV (D'Orazio et al., 2013). Otros tipos celulares de la epidermis son las células de Langerhans, presentadoras de antígenos, y las células de Merkel, sensoriales.

Subyacente a la epidermis se encuentra la dermis. Allí se hallan estructuras tales como nervios, glándulas, folículos pilosos, vasos linfáticos y sanguíneos. También hay células del sistema inmune y fibroblastos. Estos últimos depositan fibras elásticas y de colágeno en la dermis, que le otorgan elasticidad y firmeza a la piel. A diferencia de la epidermis, la dermis es libremente permeable (Gupta, 2016).

Por último se encuentra la hipodermis, compuesta principalmente por tejido adiposo, que actúa como aislante térmico, amortiguador, y reserva de energía (Lai-Cheong & McGrath, 2017).

1.3. Efectos nocivos de la radiación UV en la piel

La radiación UV es capaz de penetrar en las distintas capas de la piel en función de su longitud de onda: mientras que la luz UVB es absorbida en su mayor parte por la epidermis, la luz UVA, de mayor longitud de onda que la anterior, llega a lo más profundo de la dermis (Figura 2). Cada tipo de radiación UV puede ejercer efectos diferentes y distintivos en la fisiología de la piel y, a su vez, las consecuencias pueden ocurrir de forma aguda o tardía por la exposición acumulativa (Amaro-Ortiz et al., 2014).

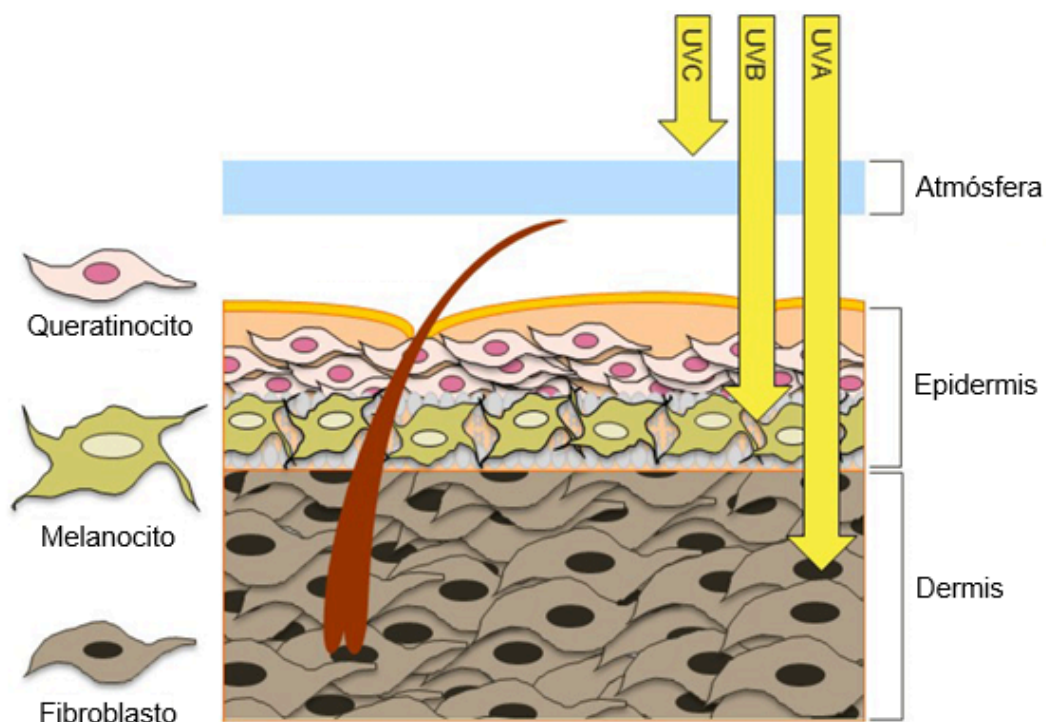


Figura 2. Penetrancia de la radiación UV en las distintas capas de la piel. Figura modificada de Amaro-Ortiz et al. (2014).

1.3.1. Efectos a nivel molecular y celular

Existen en la piel distintas moléculas que son capaces de absorber en el UV, ocasionando modificaciones en su estructura o funcionando como fotosensibilizadores, para finalmente ejercer daño celular y tisular. Estas moléculas reciben el nombre de cromóforos, e incluyen al ADN, aminoácidos aromáticos, flavinas, melanina, y NAD(P)H, entre otras (Schuch et al., 2017).

El ADN es un cromóforo capaz de absorber la radiación UVB de forma directa, siendo las lesiones más características los dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) y los 6-4 fotoproductos (6-4PP). Por otra parte, si bien la radiación UVA es pobremente absorbida por las bases del ADN, de igual manera puede inducir la formación de CPDs de forma directa, éstos tienden a persistir por más tiempo en las células y son más difíciles de reparar; esto se explicaría por la mayor penetrancia de la luz UVA en la piel, alcanzando a una mayor cantidad de células, y debido al daño adicional que genera el estrés oxidativo en las células (Courdavault et al., 2005; Mouret et al., 2006, 2010; Tewari et al., 2012). La radiación UVA puede además ejercer daño indirecto a través de procesos fotoinducidos, en donde otras moléculas cromóforas actúan como fotosensibilizadores al interactuar con dicha radiación para producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS generadas provocan daño

oxidativo en el ADN, siendo la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) la lesión típica (Cadet & Douki, 2011). Dicho estrés oxidativo también puede dañar otras biomoléculas como proteínas y lípidos, alterando su estructura y función. Las proteínas oxidadas son relativamente insolubles y su deposición intracelular en forma de agregados está relacionada al envejecimiento; asimismo contribuyen a la mutagenicidad interfiriendo con la capacidad de reparación del ADN dado que las ROS pueden oxidar proteínas que integran los sistemas de reparación del ADN (Karran & Brem, 2016; McAdam et al., 2016). Por otra parte, la peroxidación lipídica es una reacción en cadena iniciada por un radical libre, el cual genera lípidos de membrana reactivos, los cuales propagan el ciclo, ocasionando daño a nivel de la membrana celular (Polefka et al., 2012). Además, las ROS funcionan como mediadores de vías de señalización celular, por lo que el aumento de las mismas como resultado de la radiación UVA puede activar vías relacionadas con procesos que favorecen y aceleran la progresión del fotoenvejecimiento (X. Chen et al., 2021; H.-M. Liu et al., 2023).

Asimismo, la radiación UV induce roturas de simple (SSB) y doble (DSB) cadena, entrecruzamientos ADN-ADN o ADN-proteína, aberraciones cromosómicas, y otras lesiones menos frecuentes (Cadet & Douki, 2018; Wischermann et al., 2008). En la Figura 3 se resumen algunas de las lesiones típicas del ADN anteriormente mencionadas. De esta manera, ambos tipos de radiación UV ejercen mutagénesis.

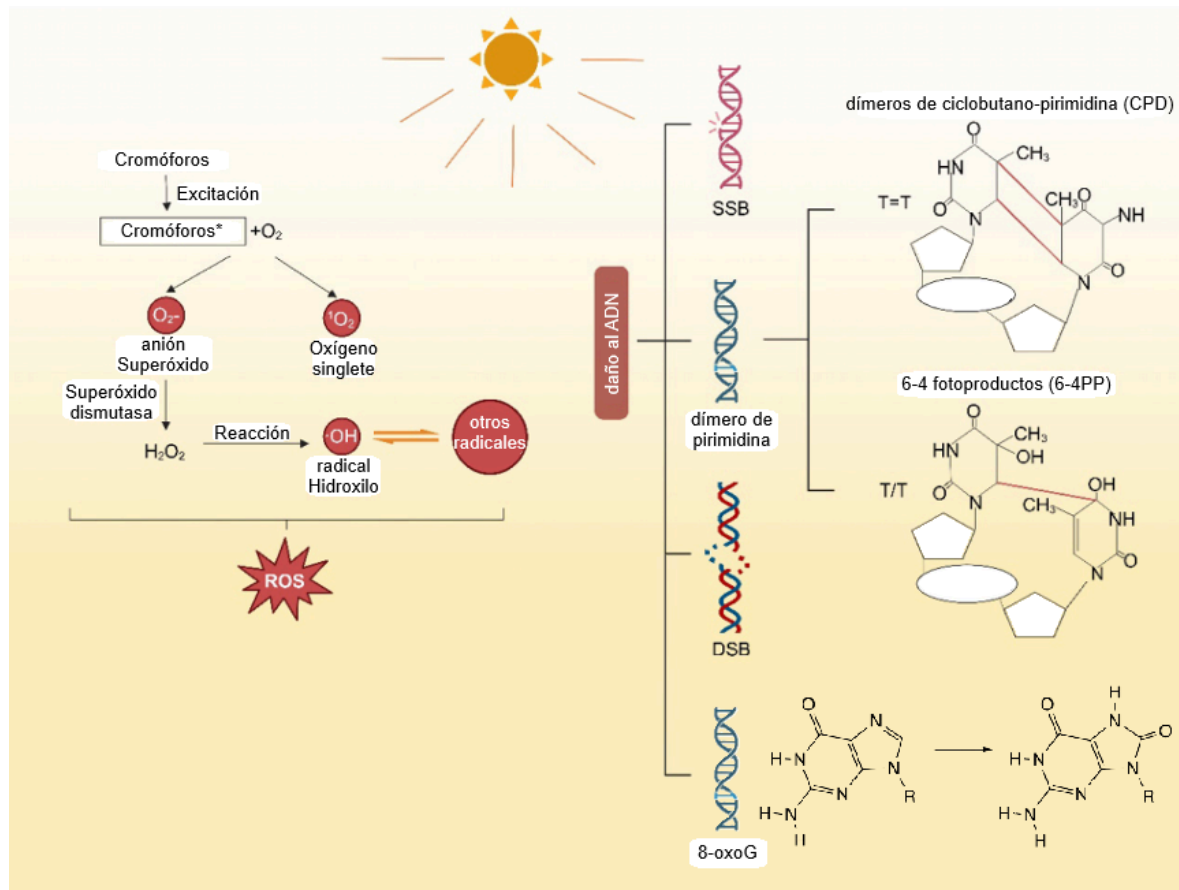


Figura 3. Lesiones del ADN más comunes causadas por la exposición a la radiación UV. SSB: *single strand break* (rotura de simple cadena), DSB: *double strand break* (rotura de doble cadena). Imagen modificada de X. Tang et al. (2024).

Ante todas las posibilidades de daño mencionadas anteriormente, en las células se activan vías de respuesta que alteran su fisiología: se induce el arresto celular, la reparación del ADN, y la muerte celular si el daño es irreversible.

1.3.2. Efectos agudos

Uno de los efectos agudos más visibles de la exposición son las quemaduras solares, que ocurren como resultado de una respuesta inflamatoria local al daño generado. Se produce una cascada de citoquinas, mediadores vasoactivos y neuroactivos, provocando edema, eritema y dolor en la piel (Christensen et al., 2017).

El proceso de bronceado es otra de las respuestas agudas, centrada en la protección de las células del daño subsecuente. Los rayos UVB al igual que los UVA estimulan la producción de melanina, mientras que la radiación UVA además ocasiona un oscurecimiento de la piel

inmediato por la redistribución de melanosomas y la oxidación de la melanina preexistente (Sklar et al., 2012).

Asimismo, luego de la exposición y la disminución de las señales al daño, se produce la proliferación robusta de los queratinocitos, conocida como hiperplasia epidérmica, que deriva en un engrosamiento de la piel (Christensen et al., 2017).

1.3.3. Efectos tardíos

Con respecto a la exposición acumulativa, una de sus manifestaciones es el fotoenvejecimiento. Se trata de un aceleramiento en el proceso de envejecimiento de la piel ocasionado por exposiciones repetidas y excesivas a la radiación UV, en donde las alteraciones encontradas son similares a aquellas observadas en el proceso de envejecimiento normal. Las características más comunes son la pérdida de la elasticidad, la aparición de arrugas, los lentigos o manchas solares, y la púrpura solar -hematomas causados por el daño solar a los vasos sanguíneos- (Han et al., 2014). Dada su mayor penetrancia, la luz UVA puede causar daño oxidativo a nivel de la dermis, alterando la conformación de las fibras de colágeno y elastina, y en consecuencia disminuyendo sus propiedades mecánicas en la piel; también se ve aumentada la expresión y secreción de metaloproteasas por parte de los fibroblastos, que degradan las mencionadas moléculas y otras proteínas estructurales de la matriz extracelular (Pillai et al., 2005; P.-W. Wang et al., 2019). El estrés oxidativo también se vincula con la activación de la senescencia celular de los queratinocitos epidérmicos, en la cual las células pierden su capacidad de proliferar, contribuyendo al deterioro del tejido (Valerio et al., 2021).

Eventualmente la exposición lleva a un estado inmunotolerante o inmunosupresor en la piel. La inflamación aguda inicial estimula una respuesta inmunosupresora que la contrarresta para retornar a la homeostasis. La activación de las células inmunosupresoras permiten que este estado inmunosupresor en la piel se expanda de forma sistémica (Salminen et al., 2022).

A través de sus diferentes mecanismos, ambos tipos de radiación UV pueden contribuir a la carcinogénesis cutánea. De hecho, el cáncer de piel es una de las neoplasias malignas más frecuentes en el ser humano a nivel mundial, y el principal factor de riesgo para su desarrollo es la exposición prolongada a la radiación UV (D'Orazio et al., 2013). Este tipo de cáncer puede clasificarse en sus tres formas más comunes: carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, colectivamente conocidos como cáncer de piel

no-melanoma, y el melanoma maligno cutáneo o simplemente melanoma (Armstrong & Kricke, 2001). El cáncer de piel no-melanoma es el tumor maligno más frecuente en Uruguay y en el mundo (Registro Nacional de Cáncer, 2024). Estos derivan de células epidérmicas, principalmente los queratinocitos; son más fáciles de tratar ya que crecen de forma lenta y no suelen metastatizar (Craythorne & Al-Niami, 2017). En cambio, el melanoma surge de los melanocitos en la epidermis, y es el cáncer de piel más agresivo de los tres, dado que genera metástasis de forma rápida y son refractarios al tratamiento (Sample & He, 2018). Actualmente en nuestro país se registra un aumento significativo en las tasas de incidencia y mortalidad por melanoma (Registro Nacional de Cáncer, 2024).

1.4. Prevención en la actualidad

Como parte de las medidas de prevención frente a los daños ocasionados por la radiación UV, las recomendaciones incluyen evitar la exposición al sol en el rango horario donde su intensidad es mayor, utilizar prendas que cubran la piel, y la aplicación de protectores solares (S. Q. Wang et al., 2010). Con respecto a éstos últimos, actualmente en su formulación se utilizan dos tipos de filtros UV: los minerales y los orgánicos.

Los filtros minerales reflejan y dispersan la luz UV, los más utilizados son el dióxido de titanio (TiO_2) y el óxido de zinc (ZnO), generalmente como nanopartículas (Schneider & Lim, 2019). En las formulaciones de protectores solares las nanopartículas se encuentran recubiertas para evitar la formación de agregados y eliminar sus propiedades fotocatalíticas. Se ha descrito que la degradación de dicha cobertura al ser liberados en ambientes acuáticos resulta en la formación de ROS, generando efectos negativos en algas, artrópodos y moluscos (Yuan et al., 2022). Asimismo se ha visto que tanto el ZnO como el TiO_2 causan blanqueamiento en corales, pudiendo llevar a la muerte de los mismos. También se ha reportado toxicidad en equinodermos y peces por parte de los metales correspondientes (Chatzigianni et al., 2022; Yuan et al., 2022).

En cuanto a los filtros orgánicos, éstos absorben la luz UV a través de un cromóforo adecuado. Además de tener un origen no renovable por tratarse de derivados de petróleo, existe una creciente preocupación sobre este tipo de filtros en cuanto a su eficiencia, seguridad para la salud humana e impacto ambiental. Se ha visto que algunos filtros son inherentemente inestables frente a la radiación UV debido a su estructura química, sufriendo isomerizaciones y/o generando productos de degradación. Otros, al ser irradiados, reaccionan con componentes de la formulación produciendo de igual manera moléculas de fotodegradación. En este fenómeno los agentes anti-UV no sólo pierden acción

fotoprotectora, sino que además la estabilidad de otros ingredientes de la formulación se ve comprometida, al igual que los productos de degradación formados pueden resultar tóxicos (Jesus et al., 2022). Por otra parte, existen estudios que indican la presencia de algunos filtros de uso actual en sangre, orina, leche materna y placenta, al ser absorbidos de forma sistémica (Janjua et al., 2008; Matta et al., 2019, 2020; Valle-Sistac et al., 2016). Además, en modelos *in vivo* se comportan como disruptores endócrinos, observándose efectos estrogénicos, androgénicos y tiroideos, e incluso alteraciones en el desarrollo de órganos reproductivos y en el sistema nervioso central (Axelstad et al., 2011; Ponzo & Carbone, 2013; Rehfeld et al., 2016; Schlumpf et al., 2004). Éstos mismos agentes se han encontrado en suelo, agua y biota. Dichas moléculas ejercen efectos negativos en diversas especies acuáticas, tales como corales (Miller et al., 2022; Wijgerde et al., 2020), algas (Giraldo et al., 2017; Mao et al., 2017), artrópodos (Boyd et al., 2021; L. Chen et al., 2018), peces (Kim et al., 2014; Weisbrod et al., 2007; Zhang et al., 2016) y otros vertebrados marinos (Cocci et al., 2020; Gago-Ferrero et al., 2013). Esto ha llevado a la prohibición de la venta y el uso de ciertos filtros UV en lugares como Palau y Hawaii, entre otros (Ouchene et al., 2019).

También han surgido discusiones sobre la efectividad de los protectores solares. El factor de protección solar (FPS) que reportan los protectores solares es una medida indicadora de la capacidad de dicha formulación de proteger frente al sol; el mismo es evaluado *in vivo* en humanos por su habilidad de prevenir la aparición de eritema visible en la piel (Schalka & Silva Dos Reis, 2011). Sin embargo, algunos protectores solares presentan moléculas antiinflamatorias que suprimen la aparición del eritema pero que no son filtros UV, por lo que “enmascaran” el resultado visible de la exposición solar sin proteger del daño (Paul, 2019).

1.5. En busca de alternativas sustentables

En vista a lo anteriormente mencionado, la situación con respecto a los filtros UV de uso actual ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos agentes fotoprotectores eficientes, seguros tanto para la salud humana como ambiental, y sostenibles en cuanto a su producción. Sobre este último punto, es deseable minimizar las repercusiones negativas que los procesos químicos de síntesis puedan tener sobre el ambiente, por lo que se busca rediseñarlos siguiendo los principios de la química verde. De forma breve, la química verde busca el uso de metodologías de bajo impacto ambiental que generen productos eficaces a través del uso de materias primas renovables, disolventes seguros, y fuentes de energía eficientes, entre otras características (Anastas & Eghbali, 2010).

En este contexto, el estudio de productos naturales como potenciales agentes anti-UV obtenidos principalmente a partir de biomasa vegetal ha estado en auge (Li et al., 2023; Resende et al., 2022; Widsten, 2020). En particular, la biomasa lignocelulósica ha resultado ser un recurso interesante, ya que se trata de un residuo industrial renovable de bajo costo que puede ser revalorizado como materia prima para la obtención de subproductos de interés (Liguori & Faraco, 2016; Ojo, 2023; Okolie et al., 2021). Es así que a partir de su tratamiento directo surgen plataformas químicas tales como el furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) y ácido levulínico, moléculas base que sirven como insumo para la síntesis de nuevas entidades moleculares (Mika et al., 2018; Okolie et al., 2021) (Figura 4). Estudios recientes describen las propiedades fotoprotectoras e inocuidad de compuestos derivados de biomasa con efecto fotoprotector frente a la radiación UV (Mention et al., 2023; Peyrot et al., 2020a, 2020b; Rioux et al., 2022a, 2022b). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que demuestren el efecto fotoprotector de este tipo compuestos frente a la radiación UV en las células de la piel.

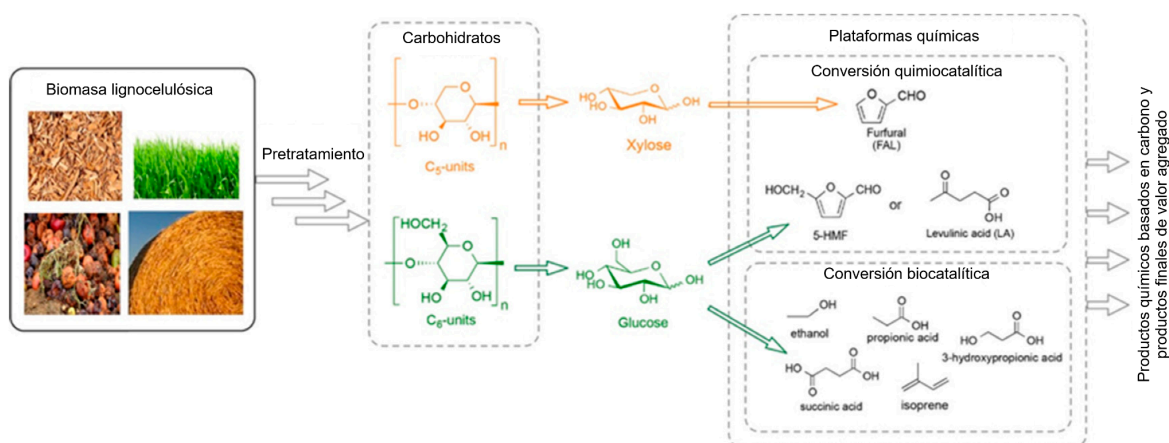


Figura 4. Proceso de obtención de plataformas químicas a partir del tratamiento de la biomasa lignocelulósica. Modificado de Mika et al. (2018).

1.6. Antecedentes del grupo de investigación

El grupo de investigación cuenta con una quimioteca de compuestos derivados de plataformas químicas renovables, como el ácido levulínico, el furfural y el 5-HMF, los cuales pueden ser obtenidos a partir del tratamiento directo de desechos de biomasa lignocelulósica. Dichas moléculas están sintetizadas en condiciones amigables con el ambiente empleando los principios de la química verde (de la Sovera et al., 2022; Ortiz et al., 2022). En cuanto a los estudios biológicos, el grupo posee experiencia en el manejo

de cultivos celulares para estudios de toxicidad y determinación de la actividad antioxidante (Cancela et al., 2020, 2025). Asimismo cuenta con experiencia en la investigación del daño y reparación de lesiones en el ADN inducidas por la radiación UV, con la optimización de distintos ensayos celulares, bioquímicos y moleculares en cultivos de queratinocitos humanos (Acosta et al., 2022; Marizcurrena et al., 2020).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo establece que compuestos sintetizados utilizando como materias primas plataformas químicas furánicas poseen actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA, y que podrían ser una alternativa sustentable frente a los protectores solares convencionales.

2.2. Objetivos

2.2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es la evaluación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA de moléculas sintetizadas a partir de derivados de biomasa lignocelulósica.

2.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el espectro UV de los compuestos.
- b) Evaluar la fotoestabilidad de los compuestos expuestos a la radiación UVA.
- c) Determinación de la citotoxicidad en cultivos de queratinocitos.
- d) Estudiar la actividad antioxidante de los compuestos.
- e) Estudiar el efecto fotoprotector frente al daño en el ADN en cultivos de queratinocitos expuestos a la radiación UVA.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos comerciales y compuestos sintetizados

Los reactivos químicos ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro), fluoresceína (3',6'-dihidroxi-3H-espiro[2-benzofurano-1,9'-xanteno]-3-ona), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio) y avobenzona (1-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona) fueron adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich. El ioduro de propidio y naranja de acridina pertenecen a la marca DeNovix.

Los 41 compuestos evaluados y el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) fueron proporcionados por el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Desarrollo de Fármacos, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay. Para la síntesis de los compuestos se utilizó furfural, 5-HMF y ácido levulínico, obteniendo un grupo de cetonas α,β -insaturadas y un grupo de compuestos del tipo imidazoheterocícllos. Las moléculas fueron sintetizadas y caracterizadas por Victoria de la Sovera y Tiago Tassano.

Cada compuesto fue disuelto en un volumen de DMSO acorde a cada peso molecular para generar soluciones stock 10 mM, las cuales se mantuvieron almacenadas a -20 °C.

3.2. Lámpara de luz UVA

Se utilizó una lámpara de luz UVA adquirida de Analytik Jena, modelo UVP Blak-Ray B-100AP, cuyo máximo de emisión se observa a una longitud de onda de 365 nm. Para calcular el tiempo de irradiación según la dosis de UVA requerida se midió la irradiancia de la lámpara previo a cada exposición con un radiómetro Spectroline DSE-100X y un sensor de luz UVA Spectroline DIX-365A. A partir de la medida del radiómetro se realizó la siguiente conversión de unidades:

$$\text{valor irradiancia } \mu\text{W}/\text{cm}^2 = (\text{valor irradiancia}) \times 10^{-6} \text{ W}/\text{cm}^2 = (\text{valor irradiancia}) \times 10^{-6} \text{ J}/\text{s} \cdot \text{cm}^2$$

Posteriormente se calculó el tiempo de irradiación en segundos en función de la dosis de UVA a la cual queremos irradiar:

$$(\text{valor irradiancia}) \times 10^{-6} \text{ J} - 1 \text{ s}$$

$$\text{dosis de UVA} - t \text{ exposición (s)}$$

3.3. Análisis UV y fotoestabilidad

A partir de las soluciones stock se prepararon nuevas soluciones de los compuestos en etanol a una concentración 10 μM , registrando sus espectros de absorción en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) en un rango de 200-550 nm correspondiente al UV-Visible. Posteriormente las soluciones fueron irradiadas con 10 J/cm^2 de luz UVA (Gag et al., 2023; Marionnet et al., 2014; Ryšavá et al., 2020) y nuevamente se registraron sus espectros. La fotoestabilidad se evaluó considerando que el espectro mantuviera su forma luego de irradiado el compuesto, y calculando el porcentaje de pérdida de absorbancia, estableciendo como límite una pérdida de hasta el 20% de la absorbancia. Dicho porcentaje se calculó a la longitud de onda donde se ubica el pico máximo de absorbancia del compuesto sin irradiar.

$$\% \text{ pérdida Abs} = \frac{\text{Abs s/UVA} - \text{Abs c/UVA}}{\text{Abs s/UVA}} \times 100$$

Como referencia se empleó la avobenzona, compuesto utilizado en filtros solares comerciales que absorbe en el rango UVA.

3.4. Actividad antioxidante

3.4.1. ABTS

La técnica de ABTS se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir al radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de color verde oscuro, a ABTS neutro incoloro, generando una caída en la absorbancia a 734 nm. Se siguió el procedimiento descrito por Re et al. (1999) ligeramente modificado. El radical se generó preparando una solución con ABTS ($C_f = 7 \text{ mM}$) y persulfato de potasio ($C_f = 2.4 \text{ mM}$) como oxidante en agua Milli-Q, e incubando a temperatura ambiente protegido de la luz por 12-16 h. Posteriormente se filtró para eliminar sólidos. Se prepararon soluciones de trabajo en etanol de los compuestos a distintas concentraciones ($C_f = 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 \mu\text{M}$). También se añadieron como referencia la avobenzona (Figura S1, Anexo), y como control positivo en las mismas concentraciones finales el compuesto antioxidante Trolox (Figura S1, Anexo). El radical se

diluyó en PBS (buffer fosfato salino, 1X, pH 7.4) hasta alcanzar una lectura de absorbancia de 0.70 ± 0.05 . El ensayo se llevó a cabo en placa de 96 pocillos colocando 190 μ L de ABTS diluido y 10 μ L de las soluciones de trabajo de los diferentes compuestos o del disolvente correspondiente (blanco). Se incubó por 10 min protegiéndolo de la luz, a temperatura ambiente y en agitación, y se midió la absorbancia a 734 nm en el lector de placas ClarioStar Plus (BMG Labtech). Cada punto se ensayó por triplicado.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos se calculó la pérdida de absorbancia como porcentaje de inhibición de la absorbancia del radical ABTS^{•+} (% Inh) para cada punto como:

$$\% Inh = \frac{Abs. blanco - Abs. muestra}{Abs. blanco} \times 100$$

A partir de este conjunto de datos se calcula la concentración efectiva media (EC50) utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, EE.UU, www.graphpad.com).

3.4.2. ORAC-FL

El ensayo ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) mide la captación del radical peroxilo, el cual apaga la fluorescencia de la fluoresceína por oxidación de la misma, registrando el nivel de fluorescencia sostenido en el tiempo ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 528$ nm). Se realizó la puesta a punto y la evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos siguiendo el procedimiento descrito por Zapata & Zapata (2019) con mínimas modificaciones. Se prepararon soluciones de fluoresceína (40 nM) en PBS, del generador de radicales AAPH (40 mg/mL) en PBS, y soluciones de trabajo en PBS de los compuestos a distintas concentraciones ($C_f = 1.25 - 2.5 - 5 - 10 - 20 - 40 - 80$ μ M), también se añadieron en las mismas concentraciones finales la avobenzona como referencia y el compuesto Trolox como control positivo. La técnica se realizó en placa negra de 96 pocillos. Inicialmente se adicionaron 25 μ L de las soluciones de trabajo de los diferentes compuestos junto a sus blancos correspondientes y 150 μ L de la solución de fluoresceína, se incubó la placa por 10 min a 37 °C en agitación. Al término, se añadieron 25 μ L de la solución de AAPH a los pocillos y se midió la fluorescencia a 528 nm a 37 °C cada 1 min durante 120 min en el lector de placas ClarioStar Plus. Como control negativo, a uno de los pocillos solamente se le añadió 200 μ L de solución de fluoresceína para observar la intensidad de fluorescencia estable en el tiempo. Cada punto se realizó por triplicado.

Para cada punto se calculó la relación f_i/f_0 , donde f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo i y f_0 es la lectura inicial de fluorescencia a tiempo 0, y posteriormente el Área Bajo la Curva (ABC) como:

$$ABC = (f_0/f_0) + (f_1/f_0) + \dots + (f_{120}/f_0)$$

Se calculó el ABC neta, restando el ABC del blanco al ABC de los compuestos. Se graficó el ABC neta en función de la concentración para cada compuesto.

3.5. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (ATCC), que fue amablemente proporcionada por la Dra. Jimena Hochmann. Las mismas fueron crecidas en medio de cultivo DMEM low glucose (Biological Industries) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Capricorn Scientific) y mantenidas en incubadora a 37 °C y 5% CO₂ en frascos de cultivo celular de 25 cm². Para los ensayos biológicos, las células fueron lavadas con PBS y disociadas empleando tripsina-EDTA 0.05% (Capricorn Scientific) a 37 °C por 10-15 min. Se realizó el recuento celular en el contador de células automático CellDrop FL (DeNovix) para sembrar la cantidad de células necesarias según el ensayo. Los ensayos que implican la irradiación de las células con luz UVA se realizaron en ausencia de SFB. Existe evidencia de que los componentes del SFB pueden alterar la respuesta de los cultivos celulares interfiriendo en la interpretación de los resultados (S. Liu et al., 2023; Wei et al., 2016; Zhou et al., 2020), por lo que los nutrientes, factores de crecimiento, vitaminas y antioxidantes presentes pueden proteger a los cultivos y de esta manera enmascarar el daño ocasionado. Asimismo se ha visto que pueden interaccionar con otros compuestos alterando la estabilidad y actividad de los mismos (F. Tang et al., 2017).

3.6. Fotoprotección frente a la radiación UVA

3.6.1. Citotoxicidad de la radiación UVA

3.6.1.1. MTT

Se determinó la viabilidad celular de cultivos de HaCaT frente a distintas dosis de radiación UVA relevantes -5, 10, 20 y 40 J/cm²- (Gag et al., 2023; Marionnet et al., 2014; Ryšavá et al., 2020) para realizar una curva dosis-respuesta, a 4 o 24 h post-irradiación. Se utilizó la técnica colorimétrica MTT que permite cuantificar de forma espectrofotométrica las células metabólicamente activas (viables) capaces de reducir el colorante tetrazol amarillo MTT a cristales violetas de formazán (Mosmann, 1983). Para esto se sembraron 50,000 células por pocillo (Vf = 0.5 mL) en placa de 24 pocillos y se incubaron por 24 h. Luego se cambió el medio de cultivo a uno sin SFB, incubando las células por 2 h previo a la irradiación. Para ensayar las diferentes condiciones la placa fue subdividida en seis cuadrantes con cuatro pocillos cada uno, según indica la Figura 5; se utilizó un cuadrante por dosis de UVA y dos cuadrantes para el control sin irradiar. El cultivo celular fue lavado con PBS y luego se agregó 150 µL de PBS e irradió con luz UVA de a un cuadrante por vez, cubriendo con aluminio los cuadrantes restantes para protegerlos de la luz. Posteriormente se continuó el ensayo según lo indicado a continuación:

- 4 h: Se incubaron las células por 4 h en medio de cultivo sin SFB con el agregado de 50 µL de una solución de MTT 5 mg/mL (Acros Organics) .
- 24 h: Se incubaron las células en medio de cultivo sin SFB por 20 h, se agregaron 50 µL de una solución de MTT 5 mg/mL y se incubó por 4 h adicionales.

Posteriormente se retiró la solución y los cristales de formazán se disolvieron con isopropanol. Se mide la absorbancia a 570 nm en el lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific). La absorbancia del control sin irradiar fue considerada como el 100% de viabilidad.

3.6.1.2. Tinción con naranja de acridina y ioduro de propidio

Se realizó un segundo ensayo para observar el efecto de la radiación UVA sobre la viabilidad de cultivos de HaCaT, utilizando las mismas dosis y tiempos de incubación

detallados en el apartado 3.6.1.1. Se evidenciaron las células vivas de las no-viables utilizando dos tipos de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN. El yoduro de propidio (IP) no es capaz de ingresar en células vivas debido a su membrana plasmática intacta, pero sí atraviesa la membrana comprometida de las células muertas emitiendo fluorescencia en el verde ($\lambda_{\text{ex}} = 502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). Por su parte, las células viables son permeables al naranja de acridina (NA) la cual emite fluorescencia en el rojo ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$). Para este ensayo se sembraron 50.000 células por pocillo ($V_f = 0,5 \text{ mL}$) en placa de 24 pocillos y se incubaron por 24 h. Luego se retiró el medio de cultivo y el residual fue eliminado realizando dos lavados con PBS. Este paso fue optimizado con respecto al equivalente en el ensayo 3.6.1.1. ya que el cambio no introdujo diferencias en los resultados. Para ensayar las diferentes condiciones la placa fue subdividida en 6 cuadrantes con 4 pocillos cada uno, según indica la Figura 5; se utilizó un cuadrante por dosis de UVA y dos cuadrantes para el control sin irradiar. Nuevamente, las células se irradiaron en 150 μL de PBS de a un cuadrante por vez, cubriendo con aluminio los cuadrantes restantes para protegerlos de la luz. Posteriormente se continuó el ensayo como se detalla a continuación:

- 4 h: Se incubaron las células con medio de cultivo sin SFB por 4 h.
- 24 h: Se incubaron las células en medio de cultivo sin SFB por 24 h.

Luego de la incubación, se recolectaron los medios de cultivo en tubos cónicos de 5 mL, uno para cada condición, haciendo un *pool* entre los pocillos de las mismas condiciones. Se realizó un lavado con PBS y éste también fue recolectado en los mismos tubos. Las células se levantaron y recolectaron en sus respectivos tubos. Éstos fueron centrifugados a 2000 rpm por 10' y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 50 μL de medio sin SFB. Se tomaron 5 μL de la suspensión celular y se mezclaron con 5 μL del reactivo con IP y NA (DeNovix), los 10 μL resultantes se contabilizaron en el equipo CellDrop FL, obteniendo el porcentaje de células viables y no-viables.

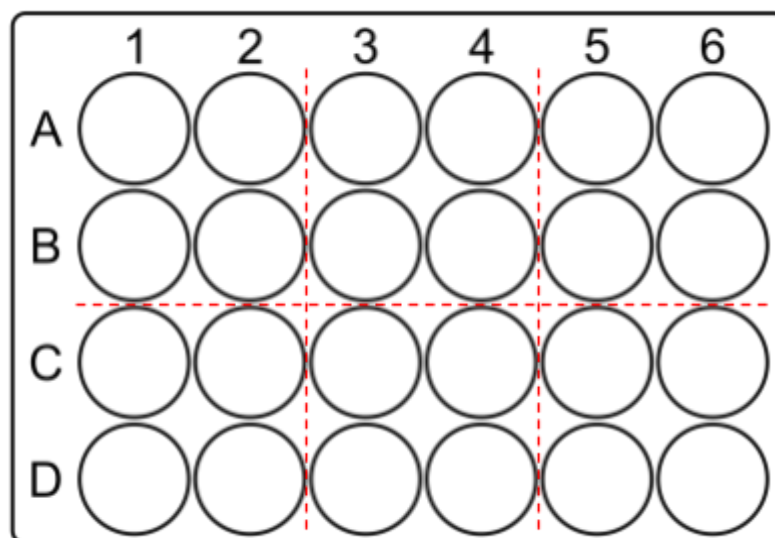


Figura 5. Representación de una placa de 24 pocillos. Las líneas punteadas rojas muestran la división por cuadrantes realizada para los ensayos de citotoxicidad de la radiación UVA.

3.6.2. Niveles de oxidantes intracelulares

Se cuantificó la capacidad de los compuestos de reducir los niveles de oxidantes intracelulares generados por la radiación UVA mediante el uso de la sonda fluorescente DCFH-DA. La molécula DCFH-DA ingresa a la célula donde es transformada a DCFH por la acción de esterasas, quedando retenida dentro de la misma. Las ROS intracelulares oxidan dicha molécula a DCF fluorescente. Para esto se siguió el procedimiento de Souza et al. (2020) con modificaciones. Se emplearon cultivos de HaCaT en placas de 35 mm ($V_f = 2$ mL) sembrando 250.000 células por placa e incubando por 24 h. Posteriormente se realizó un cambio de medio pre-incubando las células por 1 h con 2 mL de una solución 10 μ M de compuesto en medio de cultivo sin SFB, o simplemente medio sin SFB para los controles sin irradiar e irradiado. Se añadió la avobenzona como referencia y la baicaleína (Figura S1, Anexo), flavonoide con capacidad antioxidante como control positivo (Cancela et al., 2020). Al término, se retiró el medio de las placas, se realizó un lavado con PBS, y los cultivos se incubaron con 1 mL de una solución de DCFH-DA 10 μ M en PBS por 30 min. Luego de retirar el medio y realizar dos lavados con PBS las células se irradiaron con 10 J/cm² de UVA en 600 μ L de la misma solución salina. Inmediatamente después se tomaron imágenes de distintas regiones de la placa en el microscopio confocal Zeiss LSM800 con el objetivo 20X, utilizando un canal para detección de DCF ($\lambda_{ex} = 498$ nm, $\lambda_{em} = 522$ nm) y un canal

para luz transmitida (detector ESID). Las mismas fueron analizadas con el programa ImageJ, cuantificando la intensidad de fluorescencia de 50 células por imagen y promediando el valor por condición. El porcentaje de intensidad de fluorescencia (%IF) se calcula tomando como 100% al control irradiado.

3.6.3. Daño al ADN

Se identificaron DSBs generadas tras la exposición de cultivos HaCaT a la radiación UVA por inmunomarcación de γ -H2AX. Esta es la forma fosforilada de la histona H2AX y es inducida por la presencia de lesiones de doble hebra en el ADN. En una placa de 24 pocillos se colocaron vidrios (Φ 12 mm, Nr.1.0, Citoglas) desinfectados con alcohol 70%, sobre los cuales se sembraron 50.000 células por pocillo. Después de 24 h de incubación, se realizó un cambio de medio pre-incubando las células por 1 h con una solución 10 μ M de compuesto en medio de cultivo sin SFB, o simplemente medio sin SFB para los controles sin irradiar e irradiado. Se utilizó la avobenzona como referencia. Al término, se irradiaron con 10 J/cm² de UVA en 600 μ L de PBS, y luego se incubó con medio de cultivo sin SFB por 2 h. Siguiendo el procedimiento de Acosta et al. (2022) se fijaron las células con paraformaldehído 4%, se realizaron lavados con PBS, y se incubaron con buffer de bloqueo. Al término los vidrios se incubaron con anticuerpo primario γ -H2AX monoclonal de ratón (ab26350, Abcam) en dilución 1/500 en buffer de bloqueo por 24 h en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron tres lavados con buffer de bloqueo, y los vidrios se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-mouse 488 (A-11029, Invitrogen) y DAPI -marcador fluorescente de ADN nuclear- ambos en dilución 1/1000 en buffer de bloqueo; luego de repetidos lavados con PBS, los vidrios se montaron sobre portaobjetos utilizando Prolong (Invitrogen) y se dejaron reposar por 18-24 h protegidos de la luz. Se tomaron imágenes en el microscopio confocal Zeiss LSM800 con el objetivo 40X, utilizando un canal para la detección de γ -H2AX (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 520 nm) y un canal para la detección de DAPI (λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 465 nm). Las mismas fueron analizadas con el programa ImageJ, cuantificando la intensidad de fluorescencia de los núcleos y promediando sus valores. El porcentaje de intensidad de fluorescencia (%IF) se calcula tomando como 100% al control irradiado.

3.7. Gráficos y estadística

Todos los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizados en el programa GraphPad Prism. Para los análisis comparativos se utilizó el análisis de varianza one-way ANOVA o two-way ANOVA según corresponda.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis UV y fotoestabilidad

Se analizaron los espectros de absorción de 41 compuestos (200-550 nm). Se determinó que 32 compuestos presentan absorbancia en el rango UVA (315-400 nm), mientras que 9 absorben en el rango UVB (280-315 nm). Luego de irradiar los compuestos seleccionados con 10 J/cm² de luz UVA, se observó que 8 de ellos, 5 cetonas α,β -insaturadas asimétricas (QO-1, TT2076, TT2098, TT2101 y TT2102) y 3 estructuras imidazoheterocíclicas (V-I-74, V-I-103 y V-I-122), se mantienen estables con una pérdida de absorbancia inferior al 20%. En la Figura 6 se muestran sus espectros de absorción previo a la irradiación con luz UVA (10 J/cm²) y luego de la misma, detallando los valores de pérdida de absorbancia.

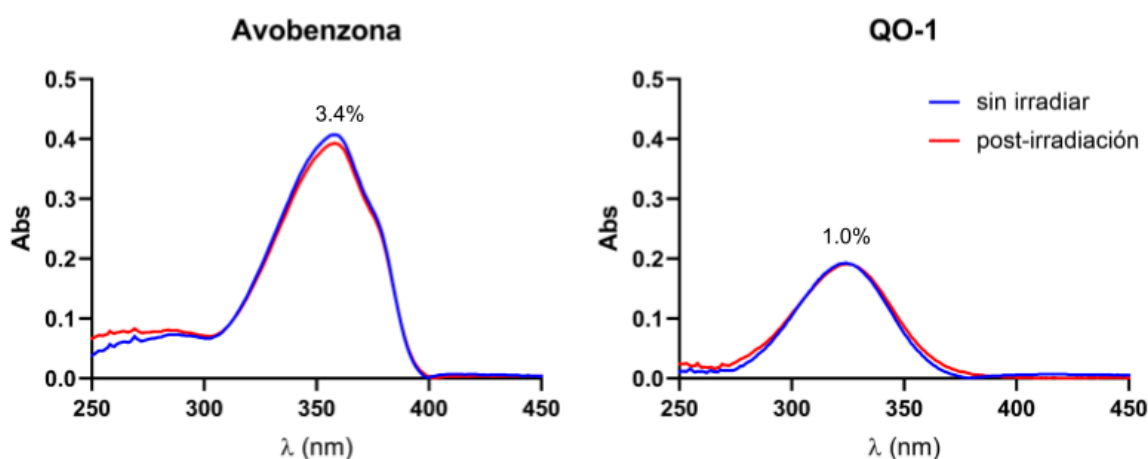


Figura 6. Espectros de absorción pre- y post-irradiación con luz UVA (10 J/cm²) de los compuestos (10 μM) en solución de etanol absoluto. En azul se representa el espectro del compuesto sin irradiar y en rojo el espectro luego de su irradiación. Se empleó avobenzona (10 μM) como referencia. Se detalla el porcentaje de pérdida de absorbancia en los máximos de absorbancia.

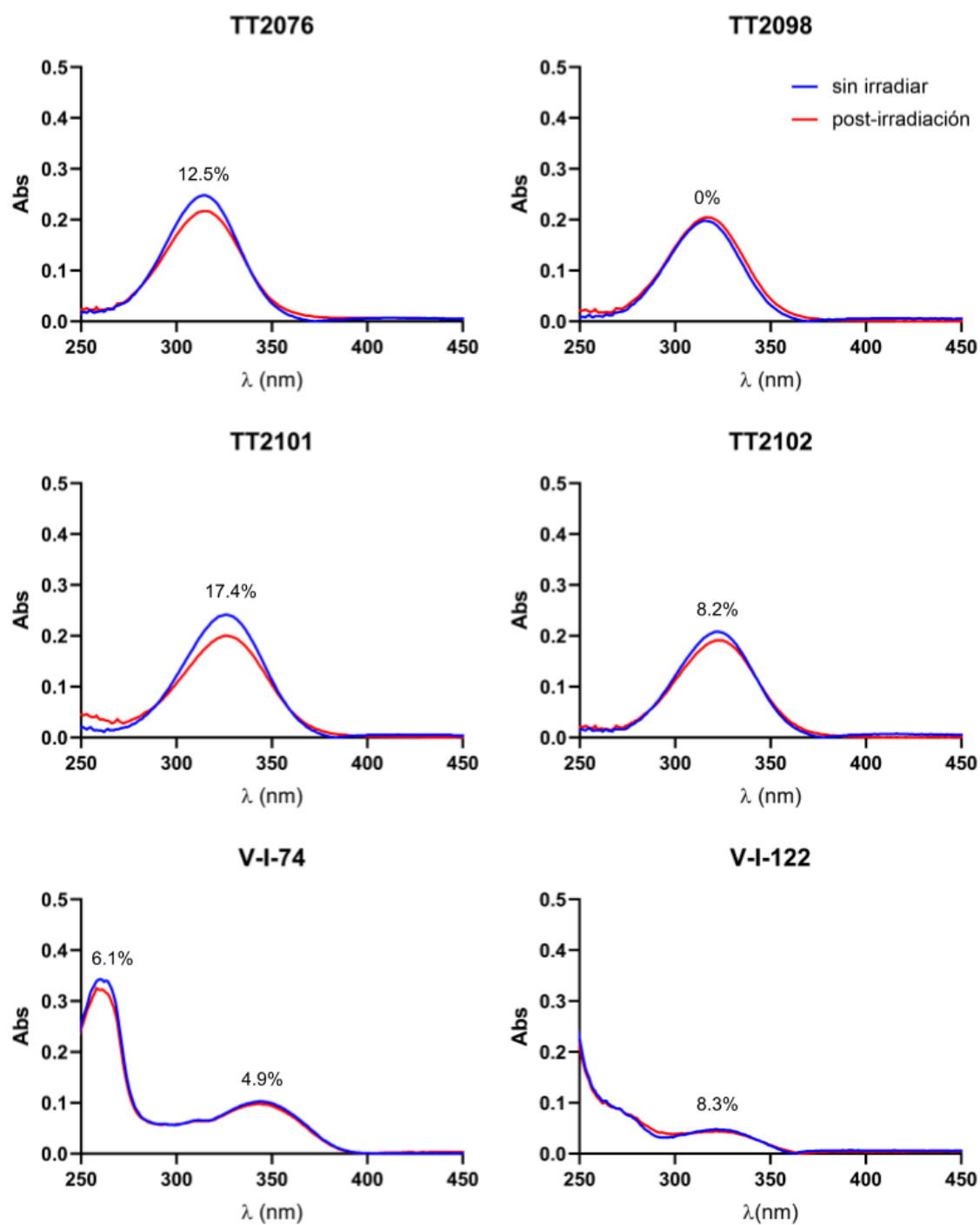


Figura 6. Continuación.

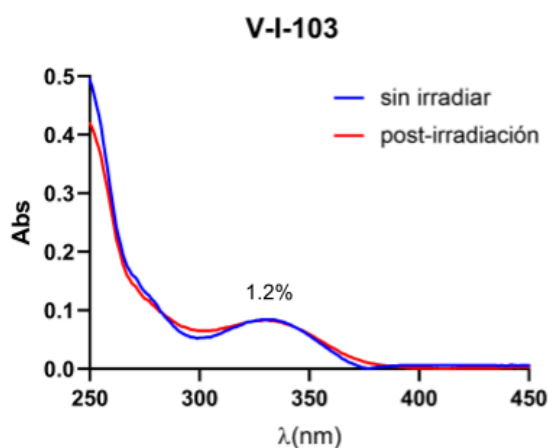


Figura 6. Continuación.

Los resultados indican que las cetonas α,β -insaturadas asimétricas presentan mejor capacidad de absorción y estabilidad estructural en el rango UVA que las estructuras imidazoheterocíclicas.

4.2. Citotoxicidad

La citotoxicidad de los compuestos fue evaluada en células HaCaT por parte de la estudiante Guillermina Pallas, pasante de pregrado del Departamento de Genética (IIBCE). Para ello se incubaron cultivos de queratinocitos con soluciones de los compuestos en un rango de concentraciones entre 5 y 40 μM . En base a los resultados de toxicidad obtenidos y a la literatura (Mention et al., 2023; Peyrot et al., 2020a, 2020b; Rioux et al., 2022a, 2022b), se escogió la concentración 10 μM para los posteriores estudios. De acuerdo a lo anterior, 6 compuestos presentaron una citotoxicidad menor al 20%.

Estas 6 moléculas, denominadas QO-1, TT2076, TT2098, TT2101, TT2102, y V-I-74, fueron seleccionadas para la realización de los ensayos posteriores. En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de viabilidad celular a 10 μM . En ambos casos también se incluye al filtro solar avobenzona utilizado como referencia.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de células HaCaT, cuantificado por ensayo MTT, al ser expuestas a los compuestos (10 μ M). Se indica el promedio $\pm$ la desviación estándar.

Compuesto	% viabilidad
Avobenzona	83,2,0 $\pm$ 13,6
QO-1	84,0 $\pm$ 10,4
TT2076	92,7 $\pm$ 10,4
TT2098	94,9 $\pm$ 6,7
TT2101	95,9 $\pm$ 7,4
TT2102	84,2 $\pm$ 14,5
V-I-74	100 $\pm$ 0

4.2.1. Citotoxicidad de la radiación UVA

La citotoxicidad de la radiación UVA en células HaCaT fue evaluada a través de dos metodologías, a cuatro dosis distintas de luz UVA (5, 10, 20 y 40 J/cm²) y al cabo de dos tiempos diferentes, 4 y 24 h, para observar el efecto de la exposición sobre la viabilidad de los cultivos a corto y largo plazo. En la Figura 7 y 8 podemos observar los resultados de citotoxicidad por ensayo MTT y por tinción con naranja de acridina (NA) y yoduro de propidio (IP). En el ensayo MTT vemos que existe un importante descenso de la viabilidad celular para las dosis 20 y 40 J/cm² en ambos tiempos. Asimismo existe una recuperación significativa de la viabilidad del cultivo a las 24 h post-irradiación para éstas mismas dosis. Por tinción con NA/IP solamente se observa una disminución con respecto al control sin irradiar para la dosis 40 J/cm² en ambos tiempos, si bien a 20 J/cm² existe una tendencia al descenso de la viabilidad ésta no fue significativa. Tampoco se observa una recuperación del cultivo en las 24 h posteriores.

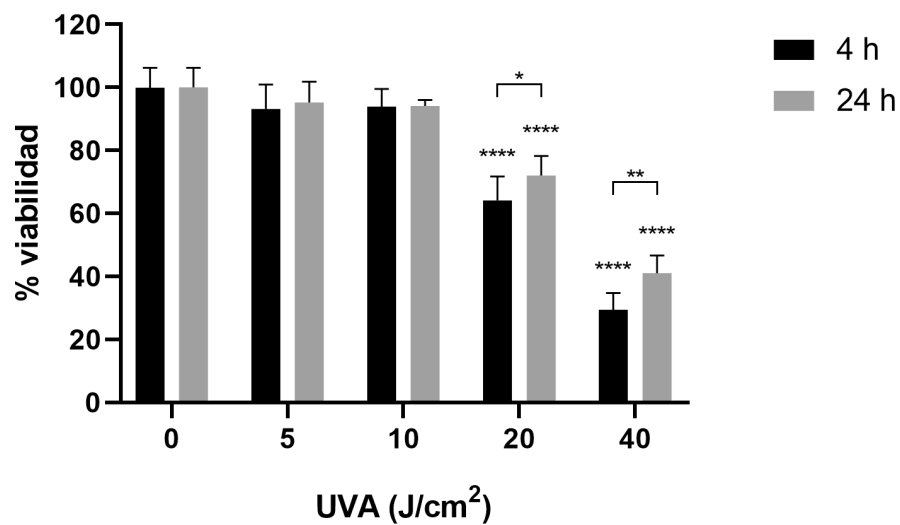


Figura 7. Citotoxicidad de luz UVA en células HaCaT por ensayo MTT. Se evalúa la viabilidad celular a 4 y 24 h post-irradiación (5, 10, 20, 40 J/cm²). Se muestran las diferencias significativas de cada dosis con el control sin irradiar, y entre una misma dosis a distintos tiempos. One-way ANOVA. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ****: $p \leq 0.0001$.

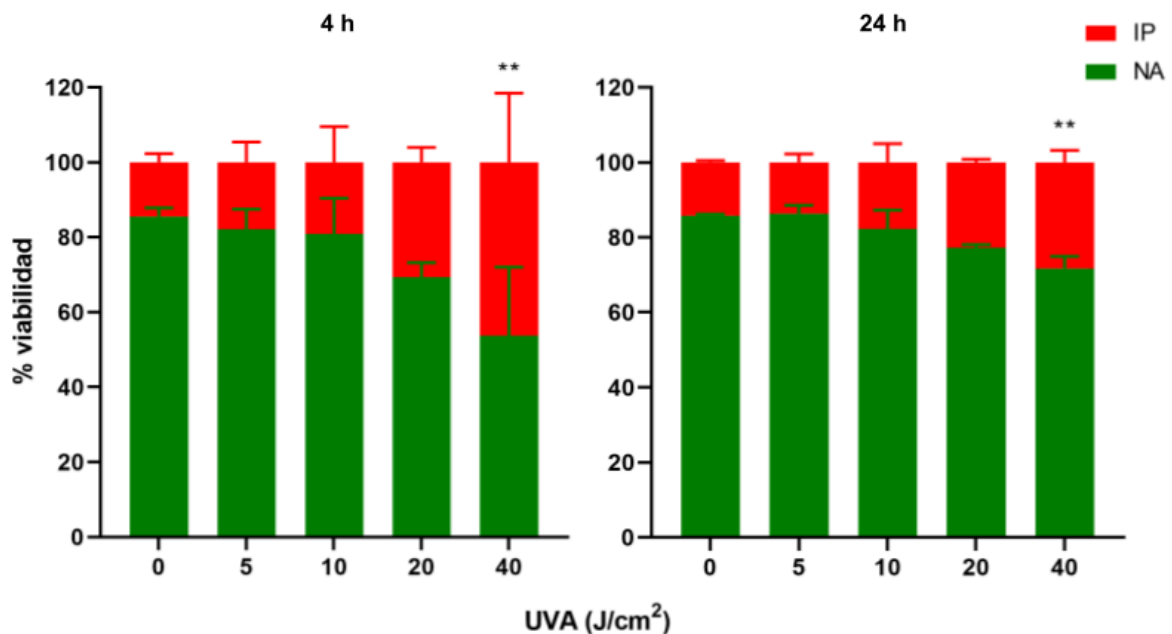


Figura 8. Citotoxicidad de luz UVA en células HaCaT por tinción con naranja de acridina (NA) y ioduro de propidio (IP). Se cuantifican las células viables y no viables a 4 y 24 h post-irradiación (5, 10, 20, 40 J/cm²). Se muestran las diferencias significativas de cada dosis con el control sin irradiar. Two-way ANOVA. **: $p \leq 0.01$.

Las diferencias en los resultados obtenidos entre ambos tipos de ensayo podría explicarse por el hecho de que estos evalúan características o funciones celulares diferentes: mientras que el ensayo MTT indica actividad metabólica, la tinción con NA/IP es un indicador de la integridad de la membrana plasmática. Es sabido que el estrés oxidativo ocasionado por la exposición a la radiación UVA puede inhibir las enzimas celulares. En este sentido, las ROS generadas podrían estar afectando a las enzimas involucradas en la reducción del MTT, con la consecuente disminución en la formación de cristales de formazán. Sin embargo, estas células aún pueden tener su membrana plasmática intacta y por lo tanto son viables a efectos del ensayo con NA/IP. Con respecto a la recuperación del cultivo observada con el paso de las horas para el ensayo MTT, los cultivos evaluados a 4 h post-irradiación mostraron una actividad metabólica inferior posiblemente debida a los efectos del estrés oxidativo. Sin embargo, los cultivos estudiados a las 24 h post-irradiación mostraron mayor viabilidad celular lo que suponemos puede deberse a una recuperación de la actividad metabólica.

Este resultado nos permitió determinar la dosis de radiación UVA a la cual se observa un descenso en la viabilidad del cultivo como resultado del daño ocasionado por la exposición. En base a los mismos se seleccionó una dosis de 10 J/cm² de trabajo para los siguientes ensayos por ser subletal para las células HaCaT.

4.3. Actividad antioxidante de los compuestos

La actividad antioxidante fue inicialmente evaluada a través del ensayo ABTS (Figura S2, Anexo), en el cual una disminución de la absorbancia a 734 nm es indicativo de la neutralización del radical ABTS^{•+}. Los porcentajes de inhibición de la absorbancia para las diferentes concentraciones de compuestos se muestran en la Figura 9. De forma cualitativa, los compuestos que demostraron una respuesta de actividad antioxidante semejante a la del control positivo Trolox, fueron la avobenzona y el compuesto V-I-74. Por otra parte, las restantes moléculas arrojaron valores de porcentaje de inhibición muy bajos, por lo que a efectos de nuestra investigación, según este ensayo, las mismas no tienen actividad antioxidante.

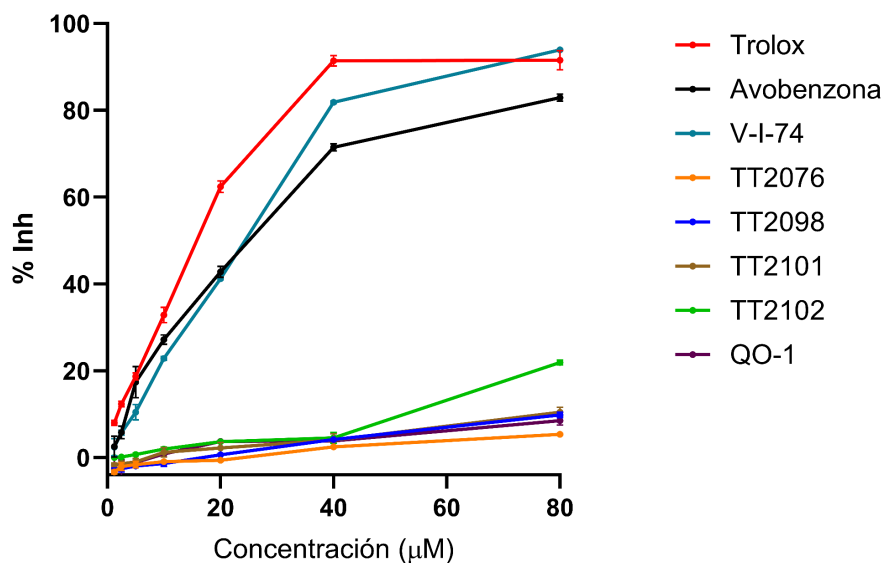


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la absorbancia (% Inh) del radical ABTS por parte de los compuestos a diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ M).

En la Tabla 2 se describen los valores de EC50 para cada compuesto evaluado, definido como la concentración de compuesto responsable del 50% de la respuesta máxima. En concordancia a lo observado cualitativamente, la avobenzona y el compuesto V-I-74 presentaron una actividad antioxidante cercana a la observada para el Trolox.

Tabla 2. Valores de EC50 para los compuestos evaluados por técnica ABTS.

Compuesto	EC50 (μ M)
Trolox	13,2
Avobenzona	22,4
V-I-74	21,9
TT2076	> 80
TT2098	> 80
TT2101	> 80
TT2102	> 80
QO-1	> 80

De forma complementaria, la actividad antioxidante fue evaluada a través del ensayo ORAC-FL. Este método determina la capacidad antioxidante de un compuesto para neutralizar radicales peroxilo, evaluando la protección frente a la oxidación de la fluoresceína. El mantenimiento de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo es indicativo de actividad antioxidante, ya que refleja la neutralización del radical peroxilo y, por ende, su incapacidad de oxidar la fluoresceína.

La Figura S3 (Anexo) muestra los gráficos cinéticos de los diferentes compuestos a distintas concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μM). En la Figura 10 se representa el área bajo la curva (ABC) neta obtenida a partir de los datos cinéticos. Cualitativamente, el compuesto V-I-74 mostró una actividad antioxidante mejor que el Trolox entre las concentraciones 1.25 a 10 μM , luego de las cuales se igualan. Los compuestos TT2076, TT2098, TT2101, TT2102 y QO-1 tienen valores de ABC neta muy similares entre sí para todas las concentraciones, y con el Trolox entre 1.25 a 10 μM . Por el contrario, la avobenzona mostró valores de ABC neta muy bajos para todas las concentraciones, por lo que a efectos de nuestra investigación, consideramos que no tiene actividad antioxidante según este ensayo.

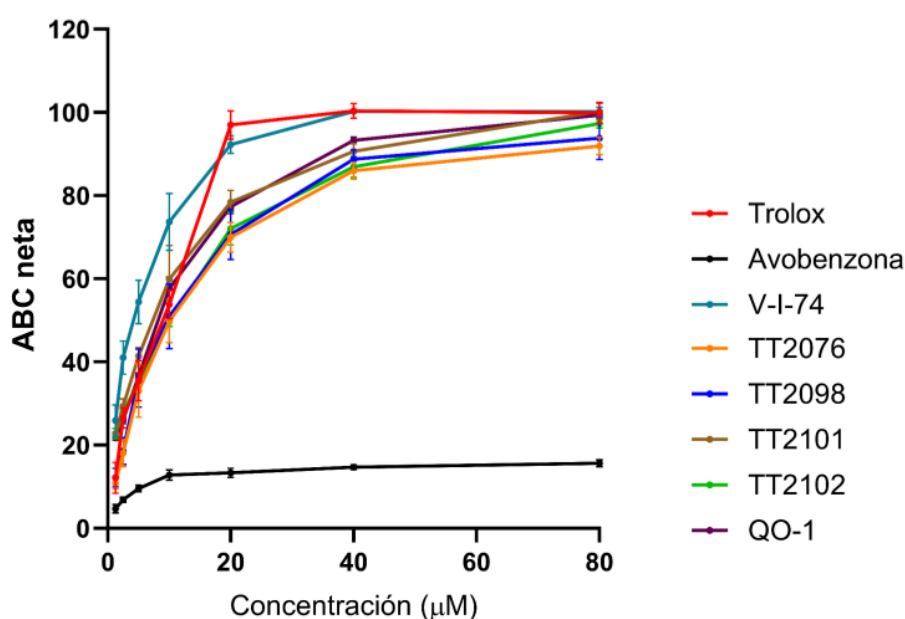


Figura 10. Área bajo la curva (ABC) neta de los compuestos a diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μM).

Los resultados observados podrían deberse a las diferencias en el mecanismo subyacente de ambos ensayos. El método con ABTS es de tipo SET (*Single Electron Transfer*) en

donde se transfiere un electrón del antioxidante para reducir al radical generado, mientras que el método ORAC-FL es de tipo HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) en el cual un átomo de hidrógeno del antioxidante es transferido al radical; por ende, de tener el compuesto actividad antioxidante, veríamos su acción en uno u otro ensayo en función de si su mecanismo es dominante en HAT o SET. Muchos antioxidantes tienen capacidad tanto HAT como SET. La dominancia depende de su estructura química, propiedades electrónicas, y el entorno donde reacciona. Se ha estudiado que el ensayo ABTS es dependiente del disolvente y del pH, viéndose mejorada la actividad de forma artificial cuanto más polar y básico sea el medio (Huang et al., 2005; Pérez Jiménez, 2007); en este caso el ensayo fue realizado en disolventes polares (etanol y PBS) y a un pH de 7.4. Por su parte el ensayo ORAC-FL también es dependiente del disolvente, viéndose favorecido cuando estos son apolares, y siendo independiente del pH (Pérez Jiménez, 2007).

El ensayo ABTS ha sido cuestionado por diversas razones. Dadas las características del radical que utiliza no es considerado un buen modelo biológico, debido a que el mismo es un radical centrado en nitrógeno que por su gran tamaño puede ejercer impedimento estérico (Schaich et al., 2015). Además, se ha observado que durante la reacción se pueden formar productos secundarios que pueden interferir en el ensayo y por ende en su resultado (Arts et al., 2004; Pérez Jiménez, 2007; Prior et al., 2005). Al ser un ensayo a tiempo final la elección del tiempo para leer la absorbancia es crítica; los antioxidantes pueden tener velocidades de reacción lentas o rápidas, por lo que si se utiliza un tiempo final corto se puede estar leyendo la actividad antes de que la reacción haya terminado, subestimando la actividad antioxidante (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005; Schaich et al., 2015). En este sentido, dado que el ensayo de ABTS se realizó a un tiempo final de 10 minutos, esto podría explicar los resultados negativos para la mayoría de los compuestos evaluados. En contraparte, el método ORAC-FL utiliza radicales peroxilo, unas de las ROS generadas en sistemas biológicos, y provee una generación continua de radicales, siendo de esta manera un modelo con mayor relevancia biológica (Schaich et al., 2015). Además, el ensayo de ORAC-FL contempla tanto el grado de actividad como la cinética de la reacción, aportando una mayor riqueza de datos que aquellos que usan un tiempo fijo. Es por ello que las comparaciones entre métodos, tanto los ensayados aquí como otros que se utilizan actualmente, son difíciles y poco recomendadas, ya que no existe buena correlación entre los mismos (Prior et al., 2005). En la misma línea, una crítica muy extendida es la variación en la forma de calcular y reportar los resultados de un mismo ensayo por diferentes laboratorios, lo cual lleva a inconsistencias en los valores de actividad antioxidante para un mismo compuesto evaluado (Olszowy-Tomczyk, 2021; Schaich et al., 2015).

En resumen y tras lo expuesto, del análisis de los resultados obtenidos a través de ambas técnicas, ABTS y ORAC-FL, encontramos que son discordantes entre sí en la mayoría de los resultados, coincidiendo únicamente en el resultado la actividad antioxidante del compuesto V-I-74. Sería interesante realizar a futuro otra técnica como EPR-SP (*Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*) para profundizar en estos resultados en caso de que este compuesto siga avanzando en sus propiedades como compuesto *hit*.

Cabe destacar que a partir de este tipo de ensayos químicos con baja (ABTS) o mediana (ORAC-FL) relevancia biológica, no es posible inferir sobre la bioactividad de un compuesto en base a los resultados de los mismos, sino que fueron utilizados como guías para evaluar su posible actividad antioxidante en un modelo celular.

4.4. Evaluación de los niveles de especies oxidantes en el modelo celular

En una segunda etapa se evaluó la capacidad de los compuestos de neutralizar los niveles de especies oxidantes intracelulares utilizando la sonda DCFH-DA en células HaCaT. Se seleccionaron los compuestos QO-1, TT2076, TT2098, TT2101, TT2102 y V-I-74 en función de los resultados obtenidos en los ensayos de ORAC-FL. Se incluyeron como controles la avobenzona y la baicaleína. En este método, a mayores niveles de especies oxidantes intracelulares se espera un mayor nivel de intensidad de fluorescencia dada por la oxidación del DCFH a DCF, molécula altamente fluorescente. La baicaleína y los compuestos ensayados lograron una disminución significativa de los niveles de especies oxidantes intracelulares (Figura 11). Los resultados de las comparaciones múltiples por one-way ANOVA de los cultivos pre-tratados con las diferentes moléculas se detallan en la Tabla S1 (Anexo). El compuesto TT2098 mostró mayor capacidad para reducir los niveles de especies oxidantes intracelulares, incluso mejor que el control baicaleína.

(a)

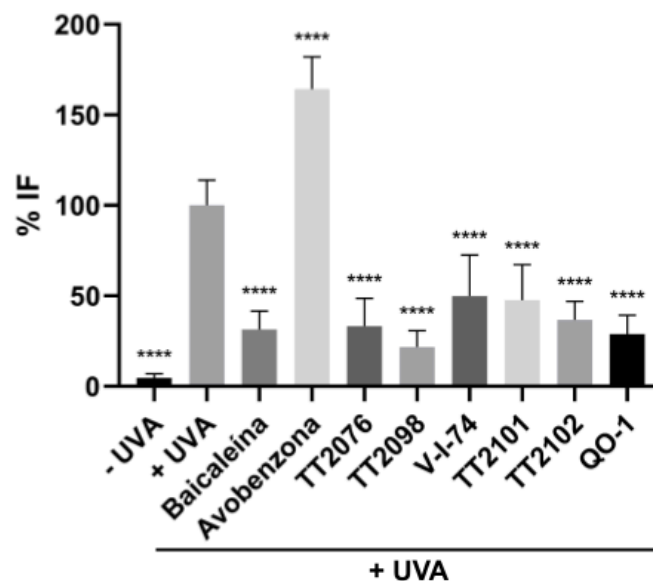


Figura 11. Capacidad de los compuestos (10 μ M) de disminuir los niveles de especies oxidantes intracelulares frente a la radiación UVA (10 J/cm²) en células HaCaT. **(a)** Nivel de especies oxidantes intracelulares expresado en porcentaje de intensidad de fluorescencia (% IF). -UVA: cultivos sin irradiar, +UVA: cultivos irradiados. Se muestran las diferencias significativas con respecto a +UVA. ****: $p \leq 0.0001$. **(b)** Imágenes representativas de cultivos HaCaT correspondientes a algunas de las condiciones experimentales mostradas en (a) de forma gráfica. Barra de escala, 20 μ m. 20X.

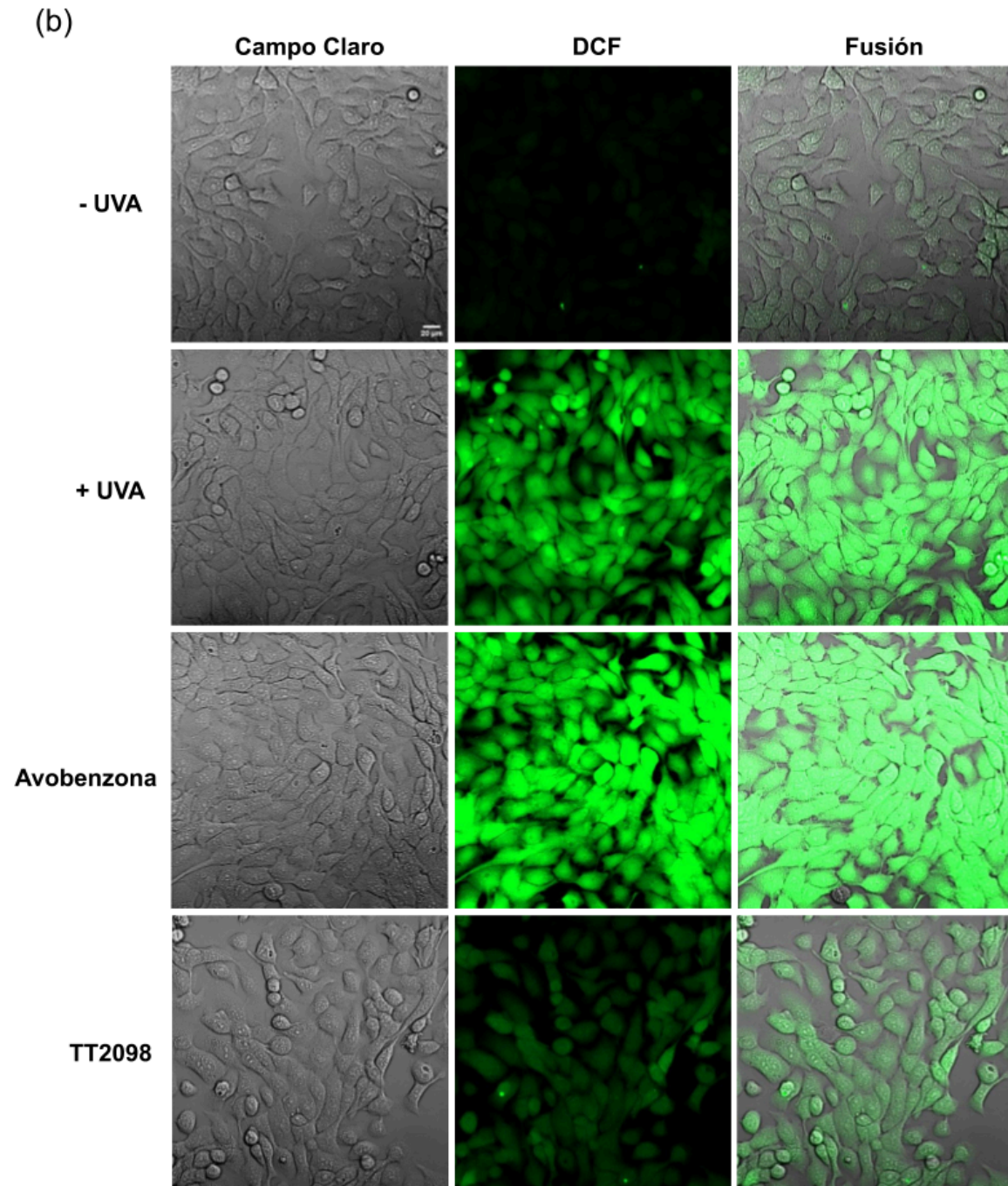


Figura 11. Continuación.

Por otra parte, el cultivo pre-incubado con avobenzona generó niveles de estrés oxidativo más altos que el control irradiado. Éste resultado se encuentra en concordancia a la literatura, ya que la avobenzona es un filtro UVA poco estable frente a la radiación, isomerizando de su forma enol a su forma ceto, y de esta manera pudiéndose descomponer en varios fotoproductos de degradación, siendo muchos de ellos radicales que aumentan los niveles de especies oxidantes intracelulares (Bonda & Lott, 2016). Es por este motivo

que las formulaciones para protectores solares suelen ser estabilizadas con otros principios activos (Afonso et al., 2014). Asimismo se ha reportado que la generación de isómeros y fotoproductos es dependiente del disolvente en el cual se encuentre y de la energía con la que es irradiada (Schwack & Rudolph, 1995). La avobenzona es una molécula insoluble en agua, formando suspensiones coloidales. Su comportamiento en agua fue estudiado observándose que se genera una conversión de la forma enol a ceto cuando esta es irradiada con luz UVA, y una fotodegradación con la aparición de nuevos productos (Hanson et al., 2020; Huong et al., 2008; Németh et al., 2023). Además, Németh et al. (2023) estudiaron el efecto del pH y la temperatura sobre este proceso, observando que la fotodegradación es favorecida a pH neutro y 25 °C. En nuestro caso, la incubación de la avobenzona se realizó en medio de cultivo sin suero a pH 7.2-7.4, siendo este un disolvente acuoso, y a 37 °C, por lo que es admisible pensar que pudo haber ocurrido una fotodegradación de la avobenzona con la formación de productos potencialmente radicalarios que puedan reaccionar con la sonda DCF aumentando la señal del mismo. La DCFH-DA es una sonda inespecífica que reacciona con diversas especies oxidantes, sin distinción entre diferentes ROS, especies reactivas de nitrógeno, entre otras (Murphy et al., 2022). También cabe aclarar que el medio de cultivo tiene otros componentes que podrían o no estar interaccionando con la molécula de avobenzona, complejizando así el sistema. Como se observa en la Figura 6 el espectro de la avobenzona se mantiene invariable luego de ser irradiada; teniendo en cuenta la información mencionada se esperaría que el espectro sea diferente por la aparición de la forma ceto u otros posibles productos de fotodegradación, sin embargo para este ensayo se utilizó etanol como disolvente y se ha observado que en los disolventes próticos polares no se observa isomerización y por ende tampoco fotodegradación. Por el contrario, si bien en el solvente polar aprótico DMSO sí se observa pérdida de absorbancia como resultado de la fotoisomerización de la forma enol a ceto (Mturi & Martincigh, 2008), en nuestro caso el espectro de absorción se realizó en una solución etanólica que incluía un 0.1% de la solución stock de avobenzona en DMSO, por lo que este disolvente no estaría afectando la estabilidad de la avobenzona frente a la radiación al momento de la medida de la absorbancia.

Para confirmar si el aumento de especies oxidantes observado en la condición con avobenzona se debe a una reacción inespecífica entre el DCFH-DA y los radicales de la avobenzona formados en el medio acuoso, realizamos un experimento en ausencia de células en el cual incubamos DCFH-DA (10 μ M) con avobenzona (10 μ M) en PBS durante 30 minutos y posteriormente la irradiamos con UVA 10 J/cm². Como controles incluimos PBS, avobenzona y DCFH-DA por separado. Finalmente, las muestras fueron analizadas en el lector de placas ClarioStar Plus (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 535 nm). Al no incluir células, no

existe una fuente de ROS que pueda reaccionar con la sonda DCFH, por lo que en esta situación pretendemos identificar si existe únicamente la reacción entre la avobenzona y el DCFH. La intensidad de fluorescencia de cada condición irradiada y sin irradiar se muestra en la Figura 12.

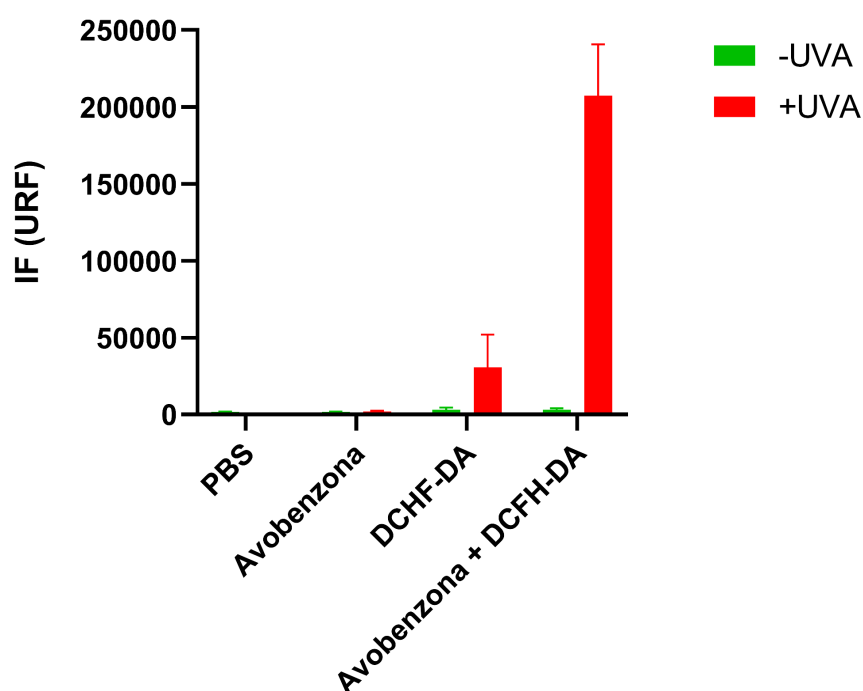


Figura 12. Intensidad de fluorescencia de una mezcla de avobenzona (10 μ M) junto con DCFH-DA (10 μ M) en PBS luego de la exposición a la radiación UVA (10 J/cm²). Como controles se incluyen PBS, avobenzona (10 μ M) y DCFH-DA (10 μ M). Cada condición se evaluó irradiada con UVA (+UVA) y sin irradiar (-UVA).

En la Figura 12 se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia cuando irradiamos al DCFH-DA en PBS, este resultado se encuentra en concordancia a la literatura, ya que está reportada la hidrólisis del DCFH-DA a DCFH en medio ligeramente alcalino y la fotooxidación del DCFH a DCF por parte de la radiación UVA (Souza et al., 2020; Yu et al., 2021). Por otra parte, existe un aumento de la intensidad de fluorescencia cuando incubamos al DCFH-DA junto con la avobenzona e irradiamos con 10 J/cm² de UVA. De acuerdo al resultado obtenido, podemos concluir que la avobenzona en medio acuoso genera especies oxidantes que reaccionan inespecíficamente con el DCFH-DA generando

un aumento de la señal de fluorescencia. Por lo tanto, esta metodología no sería apropiada para la evaluación de compuestos inestables en medio acuoso.

4.5. Daño al ADN

Se evaluó la presencia de γ -H2AX como indicador de rupturas de doble cadena en el ADN para los compuestos TT2098 y TT2102, además de la avobenzona como referencia. Los resultados mostrados son preliminares, dado que la metodología aún no fue modificada para una mejor adaptación a nuestro modelo de ensayo. Los compuestos fueron seleccionados de forma aleatoria entre los candidatos con actividad antioxidante, no siguiendo ningún tipo de preferencia.

Podemos ver en la Figura 13 que los cultivos tratados con los derivados furánicos (TT2098 y TT2102) presentaron una cantidad significativamente baja de marcaciones γ -H2AX luego de ser irradiadas con luz UVA en comparación al control irradiado con UVA. Esto nos indica que los compuestos fueron capaces de reducir lesiones de doble hebra en el ADN.

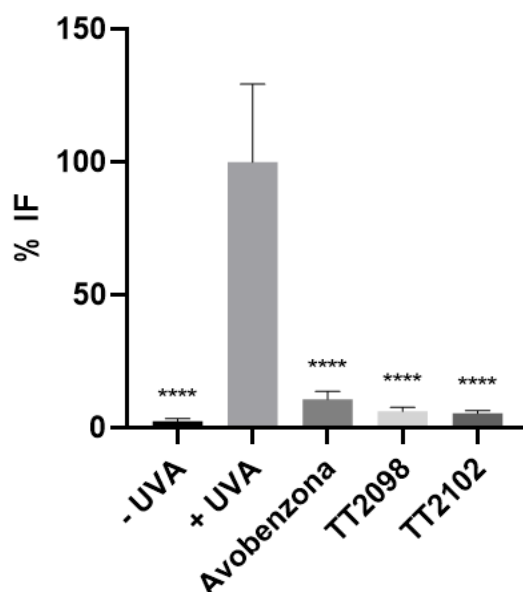


Figura 13. Fotoprotección de los compuestos (10 μ M) frente al daño de doble hebra en el ADN ocasionado por la radiación UVA (10 J/cm²) en células HaCaT. **(a)** Inmunomarcación de γ -H2AX expresada en porcentaje de intensidad de fluorescencia (% IF). -UVA: cultivos sin irradiar, +UVA: cultivos irradiados. Se muestran las diferencias significativas con respecto a +UVA. ****: $p \leq 0.0001$. **(b)** Imágenes representativas de cultivos HaCaT correspondientes a algunas de las condiciones experimentales mostradas en (a) de forma gráfica. Barra de escala, 20 μ m. 40X.

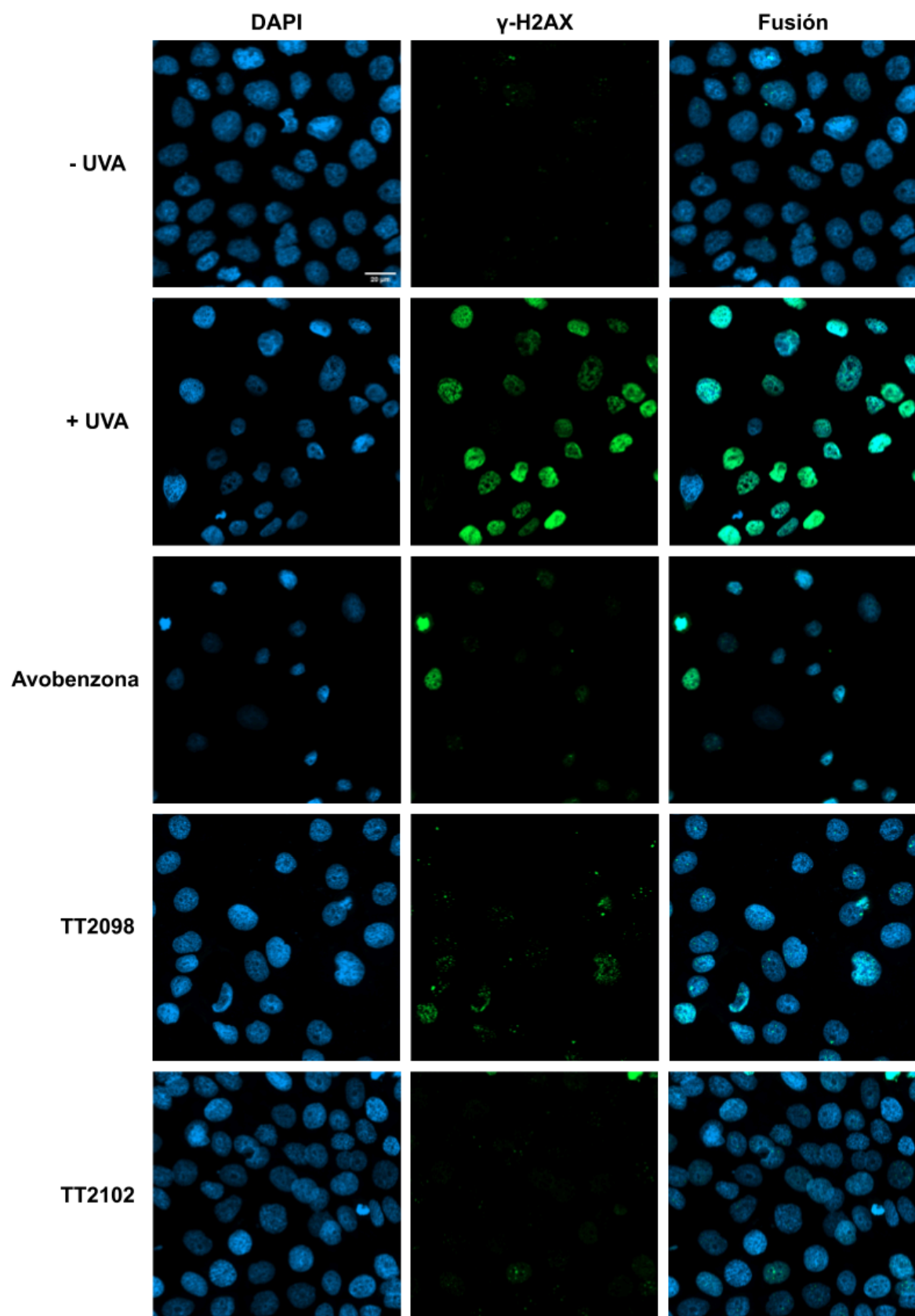


Figura 13. Continuación.

En la oxidación del ADN por UVA, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) tiene una contribución del 80% mientras que el radical hidroxilo un 20% (Cadet & Douki, 2018). El primero de ellos se caracteriza principalmente por la generación de 8-oxoG, mientras que el segundo lleva a la formación directa de rupturas de cadena. Como se mencionó con anterioridad, la radiación UVA puede inducir DSBs, sin embargo no serían por absorción directa del ADN, sino que provienen del daño oxidativo y el procesamiento de lesiones preexistentes, ya que tiene baja energía para romper directamente los enlaces fosfodiéster (Garinis et al., 2005; Greinert et al., 2012; Wischermann et al., 2008).

Existen estudios que indican la fotoreactividad del $^1\text{O}_2$ con la avobenzona (Chaudhuri et al., 2006; Paris et al., 2009). Este no solo se estaría degradando por la absorción directa de la radiación UVA, sino que también es blanco de las ROS generadas por esta. Por lo tanto, los productos radicalarios de la avobenzona podrían estar disminuyendo la cantidad de ROS que interactúan con el ADN, lo cual se traduce en una disminución del daño ocasionado. La desactivación del $^1\text{O}_2$ no necesariamente contradice los resultados obtenidos en la sección 4.4, ya que las especies oxidantes de la avobenzona podrían reaccionar de forma inespecífica con la sonda DCF, aumentando la señal de fluorescencia.

Se ha estudiado que en ADN plasmídico, desnudo y en solución, los productos de fotodegradación de la avobenzona son capaces de dañar el ADN (Damiani et al., 1999), sin embargo no hay evidencia de que pueda ingresar al núcleo, por lo que, en principio, no se puede trasladar a células vivas nucleadas. De esta manera no se observaría daño detectable en el ADN. Esto no significa que podemos afirmar que no existe daño; un estudio realizado en una línea celular de fibroblastos humanos de la piel, sin ningún tipo de exposición UV, mostró rupturas significativas de ADN cuando el cultivo fue incubado con avobenzona, pero el efecto ocurrió a concentraciones mayores a 50 μM (Vatan et al., 2023), mientras que en nuestro estudio se utilizó la concentración 10 μM .

Se deberá realizar una optimización de este ensayo con el fin de confirmar la capacidad de proteger frente al daño en el ADN, para confirmar estos resultados y también evaluar los 4 compuestos restantes que mostraron actividad antioxidante.

5. Conclusiones y perspectivas

En el presente estudio se tuvo como objetivo el estudio de compuestos derivados de plataformas químicas furánicas: cetonas α,β -insaturadas simétricas y asimétricas, y un grupo de estructuras imidazoheterocíclicas, con el propósito de evaluar si éstos son capaces de ejercer actividad fotoprotectora frente a la luz UVA en células derivadas de la piel. Con la finalidad de responder esta pregunta, se planteó una serie de ensayos que nos permitió abordar la temática. En primer lugar, se lograron obtener los espectros de absorbancia de las moléculas por espectrofotometría, y asimismo estudiar su fotoestabilidad al irradiarlos con luz UVA, identificando 8 compuestos fotoestables: 5 cetonas α,β -insaturadas asimétricas (QO-1, TT2076, TT2098, TT2101, TT2102) y 3 compuestos imidazoheterocíclicos (V-I-74, V-I-103, V-I-122). Estudios de citotoxicidad permitieron clasificar a los compuestos V-I-103 y V-I-122 como tóxicos frente a células HaCaT, por lo que continuamos los estudios con los 6 compuestos restantes. A través de dos tipos de ensayos (MTT y NA/IP) y al cabo de dos tiempos distintos (4 y 24 h) se determinaron las dosis de radiación UVA citotóxicas. Esto nos permitió determinar una dosis de trabajo para los ensayos en modelo celular (10 J/cm^2). Para el estudio de la actividad antioxidante se realizó la puesta a punto de los ensayos ABTS y ORAC-FL. Asimismo se evaluó la capacidad de los compuestos de disminuir los niveles de especies oxidantes intracelulares, con la puesta a punto del ensayo con la sonda DCFH-DA para nuestro modelo celular. Los resultados obtenidos nos permitieron identificar 6 moléculas, 5 de ellas cetonas α,β -insaturadas asimétricas (QO-1, TT2076, TT2098, TT2101, TT2102) y un imidazoheterocíclico (V-I-74), con actividad prometedora, ya que mostraron actividad antioxidante y disminución de los niveles de especies oxidantes intracelulares generadas por la irradiación de células de la piel con luz UVA. Cabe destacar que el compuesto V-I-74 fue el único compuesto que mostró buena actividad antioxidante en las dos metodologías empleadas para esta actividad, al igual que una disminución significativa de las especies oxidantes intracelulares. Como se discutió anteriormente, el DCFH-DA es una sonda no específica, por lo que el estudio podría enriquecerse con la utilización de una sonda más específica para algún tipo de ROS generado por la luz UVA. Por último, se realizó una inmunocitoquímica con el fin de observar las marcaciones de γ -H2AX, indicativas de fracturas de doble hebra en el ADN, ocasionadas por el aumento de las ROS inducidas por la radiación UVA. A través de este ensayo se pudo observar que, tanto las cetonas α,β -insaturadas asimétricas (TT2098 y TT2102), como la avobenzona, fueron capaces de reducir dichas marcaciones. La metodología utilizada fue una aproximación al objetivo, pero la misma puede ser mejorada para adaptarla a nuestro modelo y de esta forma obtener resultados más robustos. Como perspectiva apuntamos a la evaluación de los compuestos

restantes con el fin de poder identificar nuevos *hit* moleculares con actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA. Además, sería beneficioso incluir experimentos para determinar niveles de CPDs y 8-oxoG en el ADN, otros dos tipos de lesiones que pueden generarse por la radiación UVA.

En suma, la identificación de estos 6 compuestos motiva a continuar investigando sus propiedades fotoprotectoras frente a la radiación UVA. Esto abre un nuevo abanico de ensayos, tales como la fotoprotección ante la oxidación de proteínas, en particular las de reparación del ADN, así como la peroxidación lipídica, y la expresión de metaloproteasas, relacionada al desarrollo del fotoenvejecimiento. Asimismo es necesario validar su seguridad a nivel humano y ambiental. Esto último permitiría la incorporación de los compuestos avalados en formulaciones de protectores solares; llegado a este punto también puede ser explorada la sinergia entre distintos compuestos para reforzar la actividad fotoprotectora.

Este trabajo aporta evidencia sobre el potencial biológico de moléculas sintetizadas empleando plataformas químicas derivadas de biomasa en la fotoprotección, contribuyendo al desarrollo de productos seguros y ambientalmente responsables. Asimismo, promueve la valorización de la biomasa residual como fuente de moléculas funcionales.

6. Bibliografía

- Acosta, S., Canclini, L., Marizcurrena, J. J., Castro-Sowinski, S., & Hernández, P. (2022). Photo-repair effect of a bacterial Antarctic CPD-photolyase on UVC-induced DNA lesions in human keratinocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 96, 104001. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.104001>
- Afonso, S., Horita, K., Sousa E Silva, J. P., Almeida, I. F., Amaral, M. H., Lobão, P. A., Costa, P. C., Miranda, M. S., Esteves Da Silva, J. C. G., & Sousa Lobo, J. M. (2014). Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.004>
- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. (2014). Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, 19(5), 6202-6219. <https://doi.org/10.3390/molecules19056202>
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, 39(1), 301-312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>
- Armstrong, B. K., & Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 8-18. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1)
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H.-P., & Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.004>
- Axelstad, M., Boberg, J., Hougaard, K. S., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Mandrup, K. R., Nellemann, C., Lund, S. P., & Hass, U. (2011). Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter Octyl Methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250(3), 278-290. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.031>
- Bonda, C. A., & Lott, D. (2016). Sunscreen Photostability. En S. Q. Wang & H. W. Lim (Eds.),

- Principles and Practice of Photoprotection* (pp. 247-273). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29382-0_14
- Boyd, A., Stewart, C. B., Philibert, D. A., How, Z. T., El-Din, M. G., Tierney, K. B., & Blewett, T. A. (2021). A burning issue: The effect of organic ultraviolet filter exposure on the behaviour and physiology of *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 750, 141707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141707>
- Cadet, J., & Douki, T. (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(5), 1005-1007. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.51>
- Cadet, J., & Douki, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 17(12), 1816-1841. <https://doi.org/10.1039/c7pp00395a>
- Cancela, S., Canciani, L., Mourglia-Ettlin, G., Hernández, P., & Merlino, A. (2020). Neuroprotective effects of novel nitrones: In vitro and in silico studies. *European Journal of Pharmacology*, 871, 172926. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172926>
- Cancela, S., Minini, L., Mourglia-Ettlin, G., Merlino, A., Lavaggi, M. L., & Hernández, P. (2025). Novel thiazole-nitrone hybrids as innovative neuroprotective agents with antioxidant and antiapoptotic properties. *Results in Chemistry*, 16, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102414>
- Chatzigianni, M., Pavlou, P., Siamidi, A., Vlachou, M., Varvaresou, A., & Papageorgiou, S. (2022). Environmental impacts due to the use of sunscreen products: A mini-review. *Ecotoxicology*, 31(9), 1331-1345. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02592-w>
- Chaudhuri, R. K., Lascu, Z., Puccetti, G., Deshpande, A. A., & Paknikar, S. K. (2006). Design of a Photostabilizer Having Built-in Antioxidant Functionality and Its Utility in Obtaining Broad-spectrum Sunscreen Formulations†. *Photochemistry and Photobiology*, 82(3), 823-828. <https://doi.org/10.1562/2005-07-15-RA-612>
- Chen, L., Li, X., Hong, H., & Shi, D. (2018). Multigenerational effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on the survival, development and reproduction of the marine

- copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 194, 94-102.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.008>
- Chen, X., Yang, C., & Jiang, G. (2021). Research progress on skin photoaging and oxidative stress. *Advances in Dermatology and Allergology*, 38(6), 931-936.
<https://doi.org/10.5114/ada.2021.112275>
- Christensen, L., Suggs, A., & Baron, E. (2017). Ultraviolet Photobiology in Dermatology. En S. I. Ahmad (Ed.), *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (Vol. 996, pp. 89-104). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_8
- Cocci, P., Mosconi, G., & Palermo, F. A. (2020). Sunscreen active ingredients in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and their relation to molecular markers of inflammation, oxidative stress and hormonal activity in wild populations. *Marine Pollution Bulletin*, 153, 111012. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111012>
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2005). Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair*, 4(7), 836-844. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.05.001>
- Craythorne, E., & Al-Niami, F. (2017). Skin cancer. *Medicine*, 45(7), 431-434.
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.04.003>
- Damiani, E., Greci, L., Parsons, R., & Knowland, J. (1999). Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated in vitro in the presence of dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 809-816.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00292-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00292-5)
- De La Sovera, V., López, G. V., & Porcal, W. (2022). Synthetic Study of 5-Hydroxymethylfurfural in Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaction. *European Journal of Organic Chemistry*, 2022(10), e202101369.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202101369>
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin.

- International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222-12248.
<https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Gag, O., Dinu, Ștefania, Manea, H., Marcovici, I., Pînzaru, I., Popovici, R., Crăiniceanu, Z., Gyori, Z., Iovănescu, G., & Chiriac, S. (2023). UVA/UVB Irradiation Exerts a Distinct Phototoxic Effect on Human Keratinocytes Compared to Human Malignant Melanoma Cells. *Life*, 13(5), 1144. <https://doi.org/10.3390/life13051144>
- Gago-Ferrero, P., Alonso, M. B., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., Secchi, E. R., Azevedo, A., Lailson-Brito Jr., J., Torres, J. P. M., Malm, O., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2013). First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environmental Science & Technology*, 47(11), 5619-5625. <https://doi.org/10.1021/es400675y>
- Garinis, G. A., Mitchell, J. R., Moorhouse, M. J., Hanada, K., De Waard, H., Vandeputte, D., Jans, J., Brand, K., Smid, M., Van Der Spek, P. J., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R., & Van Der Horst, G. T. J. (2005). Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *The EMBO Journal*, 24(22), 3952-3962. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600849>
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. En *Nanoscience in Dermatology* (pp. 1-14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Giraldo, A., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Vidal-Liñán, L., & Beiras, R. (2017). Ecotoxicological Evaluation of the UV Filters Ethylhexyl Dimethyl p-Aminobenzoic Acid and Octocrylene Using Marine Organisms *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Paracentrotus lividus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4), 606-611. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0399-4>
- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C., & Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10263-10273. <https://doi.org/10.1093/nar/gks824>

- Gupta, P. K. (2016). Absorption, distribution, and excretion of toxicants. En *Fundamentals of Toxicology* (pp. 55-72). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805426-0.00007-X>
- Han, A., Chien, A. L., & Kang, S. (2014). Photoaging. *Dermatologic Clinics*, 32(3), 291-299.
<https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.015>
- Hanson, K. M., Cutuli, M., Rivas, T., Antuna, M., Saoub, J., Tierce, N. T., & Bardeen, C. J. (2020). Effects of solvent and micellar encapsulation on the photostability of avobenzene. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19(3), 390-398.
<https://doi.org/10.1039/c9pp00483a>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
<https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huong, S. P., Rocher, E., Fourneron, J.-D., Charles, L., Monnier, V., Bun, H., & Andrieu, V. (2008). Photoreactivity of the sunscreen butylmethoxydibenzoylmethane (DBM) under various experimental conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 196(1), 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.11.023>
- Ingold, M., De La Sovera, V., Dapuetto, R., Hernández, P., Porcal, W., & López, G. V. (2022). Greener Synthesis of Antiproliferative Furoxans via Multicomponent Reactions. *Molecules*, 27(6), 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules27061756>
- Janjua, N., Kongshoj, B., Andersson, A., & Wulf, H. (2008). Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(4), 456-461.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>
- Jesus, A., Sousa, E., Cruz, M., Cidade, H., Lobo, J., & Almeida, I. (2022). UV Filters: Challenges and Prospects. *Pharmaceuticals*, 15(3), 263.
<https://doi.org/10.3390/ph15030263>
- Karran, P., & Brem, R. (2016). Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair*, 44, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.024>

- Kim, S., Jung, D., Kho, Y., & Choi, K. (2014). Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology*, 155, 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.004>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 45(6), 347-351. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004>
- Li, L., Chong, L., Huang, T., Ma, Y., Li, Y., & Ding, H. (2023). Natural products and extracts from plants as natural UV filters for sunscreens: A review. *Animal Models and Experimental Medicine*, 6(3), 183-195. <https://doi.org/10.1002/ame2.12295>
- Liguori, R., & Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*, 215, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.054>
- Liu, H.-M., Cheng, M.-Y., Xun, M.-H., Zhao, Z.-W., Zhang, Y., Tang, W., Cheng, J., Ni, J., & Wang, W. (2023). Possible Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Skin Cellular Senescence, Inflammation, and Cancer and the Therapeutic Potential of Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3755. <https://doi.org/10.3390/ijms24043755>
- Liu, S., Yang, W., Li, Y., & Sun, C. (2023). Fetal bovine serum, an important factor affecting the reproducibility of cell experiments. *Scientific Reports*, 13(1), 1942. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29060-7>
- Lucas, R. M., Norval, M., Neale, R. E., Young, A. R., De Gruijl, F. R., Takizawa, Y., & Van Der Leun, J. C. (2015). The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 53-87. <https://doi.org/10.1039/c4pp90033b>
- Mao, F., He, Y., Kushmaro, A., & Gin, K. Y.-H. (2017). Effects of benzophenone-3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 193, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.029>

- Marionnet, C., Tricaud, C., & Bernerd, F. (2014). Exposure to Non-Extreme Solar UV Daylight: Spectral Characterization, Effects on Skin and Photoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 68-90. <https://doi.org/10.3390/ijms16010068>
- Marizcurrena, J. J., Acosta, S., Canclini, L., Hernández, P., Vallés, D., Lamparter, T., & Castro-Sowinski, S. (2020). A natural occurring bifunctional CPD/(6-4)-photolyase from the Antarctic bacterium *Sphingomonas* sp. UV9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 7037-7050. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10734-5>
- Matta, M. K., Florian, J., Zusterzeel, R., Pilli, N. R., Patel, V., Volpe, D. A., Yang, Y., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., & Strauss, D. G. (2020). Effect of Sunscreen Application on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 323(3), 256. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.20747>
- Matta, M. K., Zusterzeel, R., Pilli, N. R., Patel, V., Volpe, D. A., Florian, J., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L.-A., Ganley, C., Michele, T., & Strauss, D. G. (2019). Effect of Sunscreen Application Under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 321(21), 2082. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5586>
- McAdam, E., Brem, R., & Karran, P. (2016). Oxidative Stress–Induced Protein Damage Inhibits DNA Repair and Determines Mutation Risk and Therapeutic Efficacy. *Molecular Cancer Research*, 14(7), 612-622. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0053>
- Mention, M. M., Peyrot, C., Godon, B., Alarcán, J., Brunissen, F., Grimaldi, M., Balaguer, P., Braeuning, A., & Allais, F. (2023). Straightforward sustainable synthesis of novel non-endocrine disruptive bio-based organic UV-B filters with antimicrobial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 16(1), 2188125.

<https://doi.org/10.1080/17518253.2023.2188125>

- Mika, L. T., Cséfalvay, E., & Németh, Á. (2018). Catalytic Conversion of Carbohydrates to Initial Platform Chemicals: Chemistry and Sustainability. *Chemical Reviews*, 118(2), 505-613. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00395>
- Miller, I. B., Moeller, M., Kellermann, M. Y., Nietzer, S., Di Mauro, V., Kamyab, E., Pawlowski, S., Petersen-Thiery, M., & Schupp, P. J. (2022). Towards the Development of Standardized Bioassays for Corals: Acute Toxicity of the UV Filter Benzophenone-3 to Scleractinian Coral Larvae. *Toxics*, 10(5), 244. <https://doi.org/10.3390/toxics10050244>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13765-13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604213103>
- Mouret, S., Philippe, C., Gracia-Chantegrel, J., Banyasz, A., Karpáti, S., Markovitsi, D., & Douki, T. (2010). UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: A direct photochemical mechanism? *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(7), 1706. <https://doi.org/10.1039/b924712b>
- Mturi, G. J., & Martincigh, B. S. (2008). Photostability of the sunscreens agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzene) in solvents of different polarity and proticity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 200(2-3), 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2008.09.007>
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen

- species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651-662.
<https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>
- Németh, Z., Pirger, Z., Fodor, I., Óvári, M., & Komáromy, A. (2023). Analytical methods for investigating the presence, photoisomerisation-, and degradation kinetics of the UV-A filter avobenzone under aqueous conditions to ensure a more realistic environmental measurement. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 439, 114621. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.114621>
- Ojo, A. (2023). An Overview of Lignocellulose and Its Biotechnological Importance in High-Value Product Production. *Fermentation*, 9(11), 990.
<https://doi.org/10.3390/fermentation9110990>
- Okolie, J. A., Mukherjee, A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Next-generation biofuels and platform biochemicals from lignocellulosic biomass. *International Journal of Energy Research*, 45(10), 14145-14169.
<https://doi.org/10.1002/er.6697>
- Olszowy-Tomczyk, M. (2021). How to express the antioxidant properties of substances properly? *Chemical Papers*, 75(12), 6157-6167.
<https://doi.org/10.1007/s11696-021-01799-1>
- Ortiz, F., Tassano, T., Ingold, M., De La Sovera, V., Puerta, A., Padrón, J. M., López, G. V., & Porcal, W. (2022). Greener approach for the synthesis of nitrovinylfurans from biomass-derived 5-hydroxymethylfurfural as selective antiproliferative agents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30, 100828.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100828>
- Ouchene, L., Litvinov, I. V., & Netchiporouk, E. (2019). Hawaii and Other Jurisdictions Ban Oxybenzone or Octinoxate Sunscreens Based on the Confirmed Adverse Environmental Effects of Sunscreen Ingredients on Aquatic Environments. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 23(6), 648-649.
<https://doi.org/10.1177/1203475419871592>
- Paris, C., Lhiaubet-Vallet, V., Jiménez, O., Trullas, C., & Miranda, M. Á. (2009). A Blocked

- Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1), 178-184. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00414.x>
- Paul, S. P. (2019). Ensuring the Safety of Sunscreens, and Their Efficacy in Preventing Skin Cancers: Challenges and Controversies for Clinicians, Formulators, and Regulators. *Frontiers in Medicine*, 6, 195. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00195>
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2020). *Ross. Histología: Texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular* (8.^a ed.). Wolters Kluwer.
- Pérez Jiménez, J. (2007). *Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos*. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid.
- Peyrot, C., Mention, M. M., Brunissen, F., Balaguer, P., & Allais, F. (2020). Innovative Bio-Based Organic UV-A and Blue Light Filters from Meldrum's Acid. *Molecules*, 25(9), 2178. <https://doi.org/10.3390/molecules25092178>
- Peyrot, C., Mention, M. M., Fournier, R., Brunissen, F., Couvreur, J., Balaguer, P., & Allais, F. (2020). Expedient and sustainable two-step synthesis of sinapoyl- L -malate and analogues: Towards non-endocrine disruptive bio-based and water-soluble bioactive compounds. *Green Chemistry*, 22(19), 6510-6518. <https://doi.org/10.1039/D0GC02763D>
- Pillai, S., Oresajo, C., & Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 27(1), 17-34. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x>
- Polefka, T. G., Meyer, T. A., Agin, P. P., & Bianchini, R. J. (2012). Cutaneous oxidative stress. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11(1), 55-64. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2011.00596.x>

- Ponzo, O. J., & Carbone, S. (2013). Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phtalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology*, 311(1-2), 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.014>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Rahman, A., & Elmi, A. (2021). Air pollutants are negatively associated with vitamin D-synthesizing UVB radiation intensity on the ground. *Scientific Reports*, 11(1), 21480. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00980-6>
- Registro Nacional de Cáncer. (2024). *Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer*. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.
- Rehfeld, A., Dissing, S., & Skakkebæk, N. E. (2016). Chemical UV Filters Mimic the Effect of Progesterone on Ca²⁺ Signaling in Human Sperm Cells. *Endocrinology*, 157(11), 4297-4308. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1473>
- Resende, D. I. S. P., Jesus, A., Sousa Lobo, J. M., Sousa, E., Cruz, M. T., Cidade, H., & Almeida, I. F. (2022). Up-to-Date Overview of the Use of Natural Ingredients in Sunscreens. *Pharmaceuticals*, 15(3), 372. <https://doi.org/10.3390/ph15030372>
- Rioux, B., Combes, J., Woolley, J. M., Rodrigues, N. D. N., Mention, M. M., Stavros, V. G., & Allais, F. (2022). From Biomass-Derived p-Hydroxycinnamic Acids to Novel Sustainable and Non-Toxic Phenolics-Based UV-Filters: A Multidisciplinary Journey. *Frontiers in Chemistry*, 10, 886367. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.886367>
- Rioux, B., Mention, M. M., Alarcan, J., Abiola, T. T., Peyrot, C., Brunissen, F., Braeuning, A., Stavros, V. G., & Allais, F. (2022). Sustainable synthesis, *in silico* evaluation of potential toxicity and environmental fate, antioxidant and UV-filtering/photostability activity of phenolic-based thiobarbituric derivatives. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 116-127. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.2022219>

- Ryšavá, A., Čížková, K., Franková, J., Roubalová, L., Ulrichová, J., Vostálová, J., Vrba, J., Zálešák, B., & Rajnochová Svobodová, A. (2020). Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111948>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2022). Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin. *Inflammation Research*, 71(7-8), 817-831. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01598-8>
- Sample, A., & He, Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV -induced melanoma. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 13-24. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*, 18, 782-796. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.024>
- Schalka, S., & Silva Dos Reis, V. M. (2011). Fator de proteção solar: Significado e controvérsias. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 507-515. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300013>
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerker, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., & Lichtensteiger, W. (2004). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—An update. *Toxicology*, 205(1-2), 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.043>
- Schneider, S. L., & Lim, H. W. (2019). A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 35(6), 442-446. <https://doi.org/10.1111/phpp.12439>
- Schuch, A. P., Machado Garcia, C. C., Makita, K., & Menck, C. F. M. (2013). DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(8), 1259-1272. <https://doi.org/10.1039/c3pp00004d>

- Schuch, A. P., Moreno, N. C., Schuch, N. J., Menck, C. F. M., & Garcia, C. C. M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 110-124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>
- Schwack, W., & Rudolph, T. (1995). Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters Part 1. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 28(3), 229-234. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07118-L](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07118-L)
- Sklar, L. R., Almutawa, F., Lim, H. W., & Hamzavi, I. (2012). Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(1), 54-64. <https://doi.org/10.1039/c2pp25152c>
- Souza, C., Mônico, D. A., & Tedesco, A. C. (2020). Implications of dichlorofluorescein photoinstability for detection of UVA-induced oxidative stress in fibroblasts and keratinocyte cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19(1), 40-48. <https://doi.org/10.1039/c9pp00415g>
- Tang, F., Xie, Y., Cao, H., Yang, H., Chen, X., & Xiao, J. (2017). Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: A polyphenol-protein interaction approach. *Food Chemistry*, 219, 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.154>
- Tang, X., Yang, T., Yu, D., Xiong, H., & Zhang, S. (2024). Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: Friends and foes to the skin and beyond the skin. *Environment International*, 185, 108535. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108535>
- Tedesco, A. C., Primo, F. L., & De Siqueira Moura, M. P. (2017). Nanodrug Delivery Systems for Dermal and Transdermal Photosensitizer Drugs. En *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems* (pp. 267-280). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00014-5>
- Tewari, A., Grage, M. M. L., Harrison, G. I., Sarkany, R., & Young, A. R. (2012). UVA1 is skin

- deep: Molecular and clinical implications. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(1), 95-103. <https://doi.org/10.1039/c2pp25323b>
- Valerio, H. P., Ravagnani, F. G., Ronsein, G. E., & Di Mascio, P. (2021). A single dose of Ultraviolet-A induces proteome remodeling and senescence in primary human keratinocytes. *Scientific Reports*, 11(1), 23355. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02658-5>
- Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., Díaz, M., Ibáñez, L., Barceló, D., & Silvia Díaz-Cruz, M. (2016). Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. *Environment International*, 88, 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.034>
- Vatan, Ö., Sevinç, D., Yılmaz Çelik, D., Aurelie Allounan, A. C., Teksoy, Ö., Oral, N., Huriyet, H., Çavaş, T., & Çinkılıç, N. (2023). Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of avobenzene and octocrylene on human skin fibroblast cells. *All Life*, 16(1), 2270171. <https://doi.org/10.1080/26895293.2023.2270171>
- Wang, P.-W., Hung, Y.-C., Lin, T.-Y., Fang, J.-Y., Yang, P.-M., Chen, M.-H., & Pan, T.-L. (2019). Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. *Antioxidants*, 8(12), 569. <https://doi.org/10.3390/antiox8120569>
- Wang, S. Q., Balagula, Y., & Osterwalder, U. (2010). Photoprotection: A Review of the Current and Future Technologies. *Dermatologic Therapy*, 23(1), 31-47. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01289.x>
- Wei, Z., Batagov, A. O., Carter, D. R. F., & Krichevsky, A. M. (2016). Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Scientific Reports*, 6(1), 31175. <https://doi.org/10.1038/srep31175>
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K., & Fent, K. (2007). Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(3), 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.004>
- Widsten, P. (2020). Lignin-Based Sunscreens—State-of-the-Art, Prospects and Challenges.

- Cosmetics*, 7(4), 85. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040085>
- Wijgerde, T., Van Ballegooijen, M., Nijland, R., Van Der Loos, L., Kwadijk, C., Osinga, R., Murk, A., & Slijkerman, D. (2020). Adding insult to injury: Effects of chronic oxybenzone exposure and elevated temperature on two reef-building corals. *Science of The Total Environment*, 733, 139030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139030>
- Wischermann, K., Popp, S., Moshir, S., Scharfetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., De Gruijl, F., Hartschuh, W., Greinert, R., Volkmer, B., Faust, A., Rapp, A., Schmezer, P., & Boukamp, P. (2008). UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27(31), 4269-4280. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.70>
- Yu, D., Zha, Y., Zhong, Z., Ruan, Y., Li, Z., Sun, L., & Hou, S. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 339, 129878. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878>
- Yuan, S., Huang, J., Jiang, X., Huang, Y., Zhu, X., & Cai, Z. (2022). Environmental Fate and Toxicity of Sunscreen-Derived Inorganic Ultraviolet Filters in Aquatic Environments: A Review. *Nanomaterials*, 12(4), 699. <https://doi.org/10.3390/nano12040699>
- Zapata, D., & Zapata, P. (2019). *Estandarización del método ORAC como herramienta básica de análisis de la capacidad antioxidante de diversas sustancias* [Trabajo de grado, Universidad CES]. <http://hdl.handle.net/10946/3943>
- Zhang, Q. Y., Ma, X. Y., Wang, X. C., & Ngo, H. H. (2016). Assessment of multiple hormone activities of a UV-filter (octocrylene) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 159, 433-441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.037>
- Zhou, Q., Xie, F., Zhou, B., Li, C., Kang, Y., Wu, B., Li, L., & Dai, R. (2020). Fetal bovine serum-derived exosomes regulate the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in a cross-species manner. *Differentiation*, 115, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.06.004>

7. Anexo

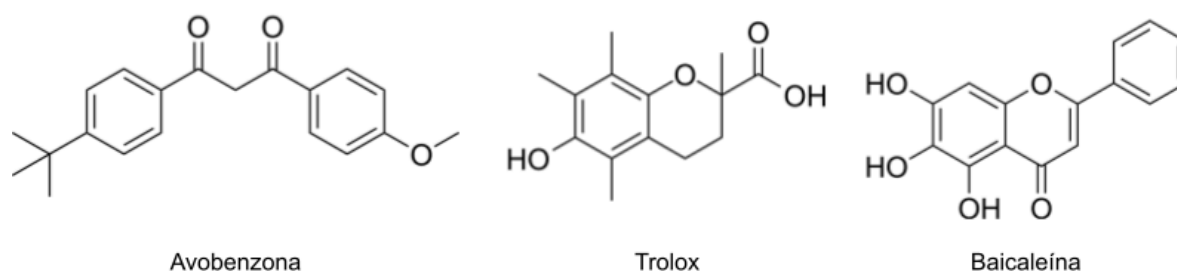


Figura S1. Estructuras de la avobenzona, trolox, y baicaleína, moléculas utilizadas como referencia en los ensayos.

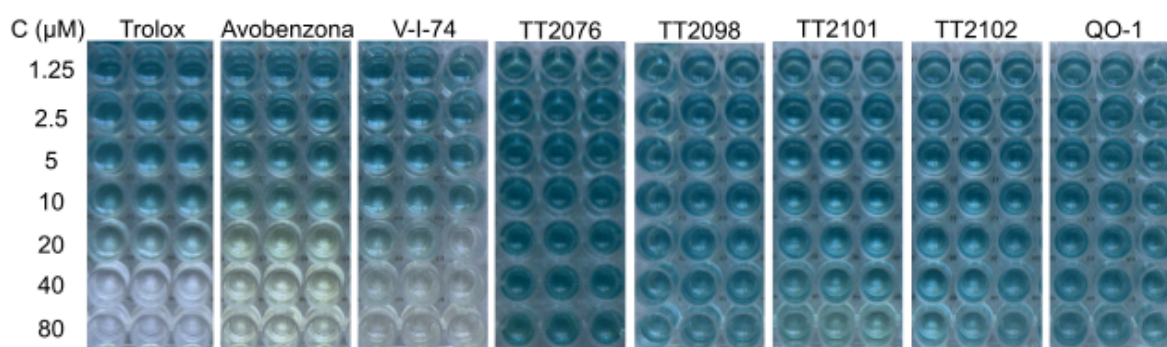


Figura S2. Curvas de inhibición del radical ABTS por parte de los compuestos a diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 µM).

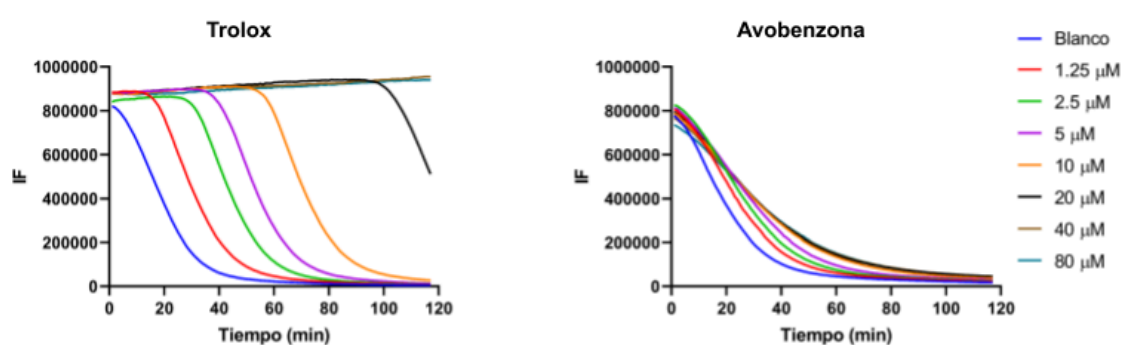


Figura S3. Gráficos cinéticos obtenidos por ORAC de los diferentes compuestos a distintas concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 µM).

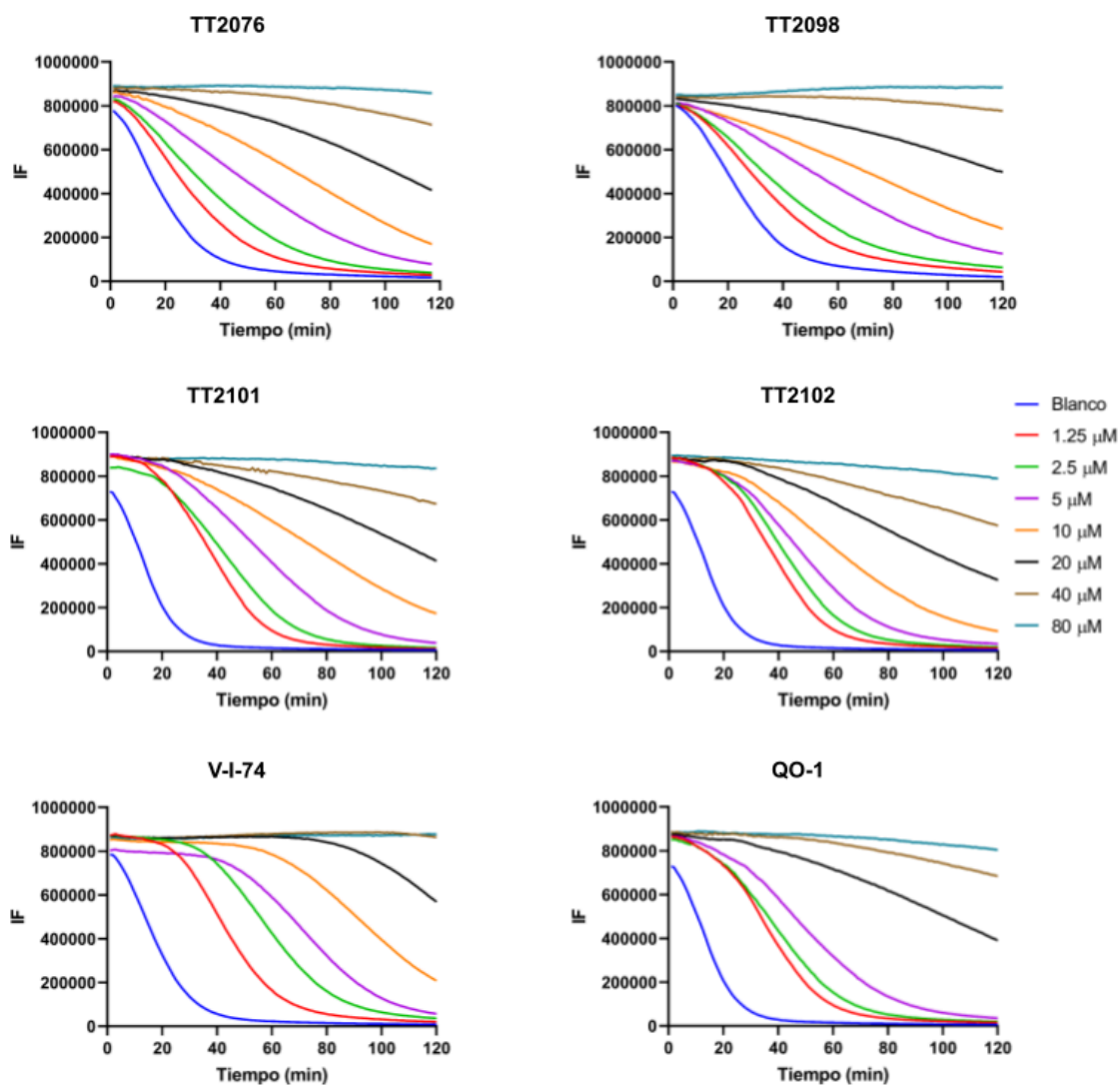


Figura S3. Continuación.

Tabla S1. Comparaciones múltiples por one-way ANOVA de los cultivos pre-tratados para el ensayo DCFH-DA en modelo celular. Bcl.: Baicaleína, Avo.: Avobenzona, ns: no significativo ($p > 0.05$), *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ ****: $p \leq 0.0001$.

	Bcl.	Avo	TT2076	TT2098	V-I-74	TT2101	TT2102	QO-1
Bcl.		****	ns	ns	**	*	ns	ns
Avo	****		****	****	****	****	****	****
TT2076	ns	****		ns	*	ns	ns	ns
TT2098	ns	****	ns		****	****	*	ns
V-I-74	**	****	*	****		ns	ns	**
TT2101	*	****	ns	****	ns		ns	*
TT2102	ns	****	ns	*	ns	ns		ns
QO-1	ns	****	ns	ns	**	*	ns	