



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol

ELOÍSA BERBEL MANAIA

Araraquara-SP
2012



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



ELOÍSA BERBEL MANAIA

Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO_2 para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr. Leila Aparecida Chiavacci

Co-orientadora: Dr. Renata Cristina Kiatkoski Kaminski

Araraquara-SP
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Manaia, Eloísa Berbel
M267d Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais
contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada
de terpinem-4-ol / Eloísa Berbel Manaia. -
Araraquara, 2012
91 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Leila Aparecida Chiavacci

Coorientador: Renata Cristina Kiatkoski Kaminski

1. Protetor solar. 2. Nanopartículas de dióxido de titânio. 3. Liberação
controlada. 4. Terpinem-4-ol. I. Chiavacci, Leila Aparecida, orient. II.
Kaminski, Renata Cristina Kiatkoski, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Aos meus pais, **Oswaldo** e **Cida**, por me incentivarem a buscar meus sonhos, por todo apoio, conforto, carinho e amor que sempre me deram, por confiarem e acreditarem no meu potencial, por orientarem meu caminho e pelos conselhos que levarei sempre em meu coração.

As minhas irmãs **Mariele** e **Juliana** que tanto amo!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me guiar sempre no Seu caminho, por nunca me desamparar, pelo amor que Ele derrama sobre meu coração, porque sem Ele eu nada sou.

A minha família, em especial aos meus pais, **Cida e Osvaldo**, as minhas irmãs **Juliana e Mariele**, ao meu cunhado **Eduardo** e as minhas sobrinhas **Sarah e Luana**, pelo amor, incentivo, força em todos os momentos e companheirismo em todo tempo que estive em Araraquara.

Agradeço a minha orientadora **Prof^ª. Dr. Leila Aparecida Chiavacci** pela dedicação, paciência, amizade, risadas e por todo conhecimento adquirido durante a realização desse trabalho.

À minha co-orientadora **Dr. Renata C. K. Kaminski**, por ter aceitado esse convite, pela amizade, paciência, por sua sinceridade, experiência, conhecimento, por não me deixar apurada com minhas ansiedades, pelas aulas de francês, companhia na academia e finais de semana e pelo carinho que ficará para sempre.

Ao **Bruno** por sua companhia em quase toda minha trajetória do mestrado, por seus incentivos, conhecimento, ajuda, bom-humor e carinho que sempre me fizeram muito bem.

Às minhas amigas **Thaís, Dani e Nájila** pela ajuda, apoio, acolhimento e amizade.

Às amigas que fiz durante a realização desse trabalho e que se tornaram pessoas muito especiais **Juliana, Eliete, Hílris, Natália, Nathália, Danila e João** agradeço pela força, companheirismo e incentivo e à minha estagiária **Marina** que foi tão doce e sempre me ajudou.

Ao professor **Marcos Antônio Corrêa** pelo apoio e orientações fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao laboratório de **Ciências dos Materiais Aplicado a Farmácia (CMAF)**, pelo espaço que tive na fase final da minha dissertação e pelos bons momentos vividos com os amigos do grupo.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial aos professores **Celso V. Santilli, Sandra Helena Pulcineli e Miguel Jafelicci Junior**, pelo espaço cedido no laboratório para a realização desse trabalho e pelos colegas **Nalva, Aline, Vanessa, Bianca, Renata, Leandro, Hudson e Eduardo** que sempre me receberam de braços abertos e pelos funcionários **Sérgio, Danúbia e Ricardo**.

À professora **Christiane Pienna Soares**, por ter cedido um espaço no laboratório de Citologia Clínica para realização dos testes de citotoxicidade, à técnica **Val** e aos alunos **Felipe, Dani, Társia, Jú Sorbo, Mauro, Rochane** que me acolheram, me ensinaram e deram todo o apoio.

À professora **Maria Virgínia C. Scarpa**, por ter cedido um espaço no laboratório de Controle de Qualidade para a realização deste trabalho e por permitir a utilização do Microette e do HPLC.

À **Valerie Brioi e Florian Menau** que permitiram a realização de um estágio no SOLEIL.

Ao professor **João Aristeu da Rosa** pela utilização do microscópio de luz polarizada.

Ao professor **André Baby** por me acolher em seu laboratório para a utilização do Labsphere, por suas contribuições valiosas para este trabalho e também aos seus alunos que me ajudaram a utilizar o equipamento, em especial à **Dani**.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), em especial a técnica de laboratório **Fátima Rodrigues** por sempre estar pronta para ajudar e aos funcionários **Ana Cristina, Queila e Vinícius**.

À Seção de Pós-graduação

À FAPESP, pela ajuda financeira com a bolsa de mestrado e a reserva técnica.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”.

Antoine de Sain't Exupéry

RESUMO

A incidência de câncer de pele em todo o mundo cresce exponencialmente principalmente devido à exposição freqüente à radiação ultravioleta (UV). O uso de protetor solar é a medida mais eficaz para a sua prevenção. O dióxido de titânio (TiO_2) é um filtro inorgânico que atua espalhando, refletindo e absorvendo a radiação UV, é fotoestável, hipoalergênico, entretanto, deixa a pele com aspecto esbranquiçado dependendo do tamanho da partícula. Hoje em dia há uma procura grande por produtos multifuncionais e o uso de estruturas líquido-cristalinas vem crescendo cada vez mais por promover a liberação controlada de ativos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas multifuncionais líquido-cristalinos contendo nanopartículas de TiO_2 transparentes capazes de agir como fotoprotetores e de liberar terpinem-4-ol (terpeno com atividade antioxidante) de forma controlada prevenindo e/ou tratando o câncer de pele. O teste de citotoxicidade mostrou que as nanopartículas de TiO_2 obtidas através do processo sol-gel não foram citotóxicas para as duas linhagens de células testadas (queratinócitos de pele humana – HaCaT e fibroblastos de pulmão humano – MRC-5), evidenciando o uso deste material nos humanos sem causar danos. O potencial zeta das nanopartículas indicou que entre pH 5 e 7, que não é agressivo para pele humana, é possível evitar aglomeração das nanopartículas por estas apresentarem cargas superficiais significativas. Os dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo e microscopia de luz polarizada mostraram que foi possível manter a estrutura líquido-cristalina das formulações com a presença de nanopartículas de TiO_2 e terpinem-4-ol. O teste de liberação *in vitro* das formulações contendo 1 e 5% de terpinem-4-ol mostraram que o sistema líquido-cristalino controlou a liberação do ativo (liberação de cerca de 13 % em 12 horas), sendo o modelo matemático de zero ordem o que melhor se ajustou ao perfil de liberação. As formulações com xerogel seco a 60 °C tiveram atividade fotoprotetora mais parecido com o TiO_2 comercial na região UVB. As formulações com xerogel com tratamento térmico a 450 °C tiveram atividade fotoprotetora da região UVA otimizada e ainda todas as formulações apresentaram amplo espectro de proteção. As formulações apresentaram-se bem mais transparentes com os xerogeis desenvolvidos neste trabalho do que com o TiO_2 de uso comercial.

Palavras-chave: protetor solar; nanopartículas de dióxido de titânio; liberação controlada; terpinem-4-ol

ABSTRACT

The incidence of skin cancer growth exponentially in all the world mainly due to the frequent ultraviolet (UV) radiation exposition. The sunscreen use is one of the efficient manners to prevent the skin cancer. The titanium dioxide (TiO₂) is an inorganic filter which works scattering, reflecting and absorbing the UV radiation, it is photostable, hypoallergenic, but it presents a whiteness appearance depending on the particle size. Nowadays there is a high demand for multifunctional products and the use of liquid crystal has been increasing because it promotes active controlled delivery. The propose of this work is to develop liquid crystalline multifunctional systems with transparent TiO₂ nanoparticles able to photoprotect the skin and release in a controlled manner terpinem-4-ol (a terpen with antioxidant activity) to prevent and/or treat the skin cancer. The cytotoxicity assay showed that TiO₂ nanoparticles obtained by sol-gel process weren't cytotoxic to the two cell lines tested (human skin keratinocytes – HaCaT and human lung fibroblasts – MRC-5), evidencing the use of this material on the humans without dangers. The nanoparticles zeta potential indicated that at pH about 5 and 7, pH that is not irritative to the human skin, it's possible to prevent nanoparticles aggregation due to their significative superficial charges. The small angle scattering X rays and light polarized microscopy data showed that it is possible to maintain the liquid crystalline structure of the formulations with the presence of TiO₂ nanoparticles and terpinem-4-ol. The *in vitro* terpinem-4-ol release assay of the formulations containing 1 and 5% of terpinem-4-ol showed the controlled release of the liquid crystalline systems (liberation at about 13% in 12 hours), being zero order the best mathematical model that fit the release profile, indicating that the formulation release the same amount of drug per time unit. The formulations with xerogel dried at 60 °C presented photoprotective activity more similar with commercial TiO₂ in the UVB region. The formulations with xerogel heat treatment at 450 °C presented improvement of the photoprotective activity in the UVA region and all formulations showed broad-spectrum protection. The formulations presented more transparent with xerogels developed at this work than commercial TiO₂.

Key-words: sunscreen; titanium dioxide nanoparticles; controlled release; terpinem-4-ol

Lista de Figuras

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPINEM-4-OL (REICHLING ET AL., 2006).	31
FIGURA 2 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE XEROGEL DE TiO ₂ ATRAVÉS DO PROCESSO SOL-GEL.	35
FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL DOS TENSOATIVOS ÁLCOOL CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO E CETETH-10.....	38
FIGURA I.1 - FOTO DO XEROGEL OBTIDO ATRAVÉS DO PROCESSO SOL-GEL E DO TiO ₂ DE USO COMERCIAL.	44
FIGURA I.2- ESTRUTURAS MOLECULARES DO MTT, DO VIOLETA CRISTAL E DO ÁCIDO P- TOLUENO SULFÔNICO (PTSH).	46
FIGURA I.3- ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (VIOLETA CRISTAL) EM CÉLULAS HACAT. PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIVAS APÓS CONTATO COM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE XEROGEL DE TiO ₂ NAS CONCENTRAÇÕES 50, 25, 12,5, 6,25 E 3,125 % (P/V). DADOS REFEREM-SE A MÉDIA DE TRÊS EXPERIMENTOS IND INDEPENDENTES (MÉDIA ± ERRO PADRÃO).	46
FIGURA I.4 - ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (VIOLETA CRISTAL) EM CÉLULAS MRC-5. PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIVAS APÓS CONTATO COM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE XEROGEL DE TiO ₂ NAS CONCENTRAÇÕES 50, 25, 12,5, 6,25 E 3,125 % (P/V). DADOS REFEREM-SE A MÉDIA DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES (MÉDIA ± ERRO PADRÃO).	46
FIGURA I.5 - POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ EM FUNÇÃO DO pH E PONTOS ISOELÉTRICOS (PI).	47
FIGURA II.1 - FOTOGRAFIAS DE MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA DE QUATRO FORMULAÇÕES LÍQUIDO-CRISTALINAS, SENDO (A) 30% PALMITATO DE ISOPROPILA, 35% ÁLCOOL CETÍLICO ETOXILADO E PROPOXILADO, 35% ÁGUA, (B) FORMULAÇÃO BASE I, (C) FORMULAÇÃO BASE II E (D) FORMULAÇÃO BASE III.	50
FIGURA II.2 - GRÁFICO DE SAXS DAS FORMULAÇÕES BASE I (A), II (B) E III (C).....	51
FIGURA II.3 - FOTOS DE FORMULAÇÕES CONTENDO 30% DE XEROGEL DE TiO ₂ P0,2H2,3, P0,5H1 E P2H2,3 E DE 15% DE TiO ₂ DE USO COMERCIAL. NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA SÃO COMPOSTAS POR FORMULAÇÕES BASE III E NA PARTE INFERIOR SÃO COMPOSTAS POR FORMULAÇÕES BASE II.	53
FIGURA II.4 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA DE FORMULAÇÕES BASE III COM (A) 5% DE XEROGEL P0,05H1 (E) 30% DE XEROGEL P0,2H2,3 (F) 30% DE XEROGEL P2H2,3; FORMULAÇÕES BASE II COM (B) 10% DE XEROGEL P0,5H1 (C) 10% XEROGEL P0,05H2.3; FORMULAÇÕES BASE I COM (D) 10% DE XEROGEL P0,1H2,3.....	54
FIGURA II.5 - GRÁFICO DE SAXS DAS FORMULAÇÕES BASE II COM A INCORPORAÇÃO DE 30 % DE XEROGEL P0,5H1 (A), P0,05H1(C), P0,2H2,3(E) E P2H2,3(G) E 40% DE P0,5H1 (F). A FORMULAÇÃO (H) É A FORMULAÇÃO BASE I COM A INCORPORAÇÃO DE 15 % DE XEROGEL P0,5H1. AS FORMULAÇÕES B, D SÃO FORMULAÇÕES BASE III CONTENDO 30% DE XEROGEL P0,2H2,3(B) E P0,5H1(D), RESPECTIVAMENTE.....	55

FIGURA II.6 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA DAS FORMULAÇÕES (A) 1, (B) 2, (C E D) 4 (1%) E (E E F) 4 (5%) LISTADAS NA TABELA 2.	57
FIGURA II.7 – CURVA DE SAXS DA FORMULAÇÃO 4 LISTADA NA TABELA 2 CONTENDO 1% (A) E 5% (B).....	57
FIGURA II.8 - INJEÇÃO DO PADRÃO (A) E DO PLACEBO DA FORMULAÇÃO (B).....	58
FIGURA II.9 - CURVA ANALÍTICA DO TEPINEN-4-OL, EQUAÇÃO DA RETA (Y) E O RESPECTIVO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R^2).	59
FIGURA II.10 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DAS FORMULAÇÕES 4 COM 1 E 5% DE ATIVO E DE TERPINEM-4-OL SOLUBILIZADO EM PROPILENOGLICOL A 1 E 5%	61
FIGURA II.11 - ESQUEMA DE LIBERAÇÃO DO ATIVO E A CONSTANTE DE LIBERAÇÃO K_1 E CONSTANTE DE PERMEAÇÃO K_2 ENVOLVIDAS NO PROCESSO GLOBAL DE LIBERAÇÃO. ...	61
FIGURA II.12 - MODELO DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE ZERO ORDEM	63
FIGURA III.1 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DE ABSORBÂNCIA DE RADIAÇÃO UVA E UVB PARA CÁLCULO DO λ CRÍTICO (DIFFEY ET AL., 2000).	64
FIGURA III.2 - GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO DIFERENTES COMPOSIÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE XEROGEIS, TiO_2 COMERCIAL, METOXINAMATO DE OCTILA E PTSH.....	65
FIGURA III.3 - GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DAS FORMULAÇÕES BASE III CONTENDO DIFERENTES COMPOSIÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE XEROGEIS, TiO_2 COMERCIAL, METOXINAMATO DE OCTILA E PTSH.....	65
FIGURA III.4 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO XEROGEL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO_2 COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.	67
FIGURA III.5 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE III CONTENDO XEROGEL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO_2 COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.	68
FIGURA III.6 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE II (À ESQUERDA) E III (À DIREITA) CONTENDO XEROGEL A 30% EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO_2 COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.....	68
FIGURA III.7 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO 30% DE XEROGEL NA FORMULAÇÃO BASE II.	70
FIGURA III.8 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO 30% DE XEROGEL NA FORMULAÇÃO BASE III.....	71
FIGURA III.9 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO XEROGEL P0,05H1 NA FORMULAÇÃO BASE III.	72
FIGURA III.10 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO XEROGEL P0,5H1 NA FORMULAÇÃO BASE III.	73
FIGURA III.11 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO XEROGEL P0,05H1 NA FORMULAÇÃO BASE II.....	74

FIGURA III.12 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS CONTENDO XEROGEL P0,5H1 NA FORMULAÇÃO BASE II.....	75
FIGURA III.13 - GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO 30 % DE XEROGEIS COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C, SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) E COM 15% DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COMERCIAL.	76
FIGURA III.14 - GRÁFICO DAS ABSORBÂNCIAS DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO 30 % DE XEROGEIS COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C, SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) E COM 15% DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COMERCIAL.	76
FIGURA III.15 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO XEROGEL A 30% COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C E SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO ₂ COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE O ONDA CRÍTICO.	77
FIGURA III.16 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE III CONTENDO XEROGEL A 30% COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C E SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO ₂ COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.	77
FIGURA III.17 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DA ÁREA SOB A CURVA DAS FORMULAÇÕES BASE II (À ESQUERDA) E III (À DIREITA) CONTENDO XEROGEL A 30% COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C EM RELAÇÃO A FORMULAÇÃO CONTENDO TiO ₂ COMERCIAL A 15% E SEUS RESPECTIVOS COMPRIMENTO DE ONDA CRÍTICO.	78
FIGURA III.18 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS DAS FORMULAÇÕES BASE II CONTENDO 30 % DE XEROGEIS COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C, SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) E COM 15% DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COMERCIAL.	79
FIGURA III.19 - GRÁFICOS DA REFLECTÂNCIA DIFUSA DE AMOSTRAS DAS FORMULAÇÕES BASE III CONTENDO 30 % DE XEROGEIS COM TRATAMENTO TÉRMICO A 450 °C, SEM TRATAMENTO TÉRMICO (SECO A 60 °C) E COM 15% DE DIÓXIDO DE TITÂNIO COMERCIAL.	80

Lista de Tabelas

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DAS TRÊS FORMULAÇÕES DE ESCOLHA DE TRABALHO.....	40
TABELA 2 - DESCRIÇÃO DAS FORMULAÇÕES ESCOLHIDAS PARA INCORPORAÇÃO DE 1 % DE TERPINEM-4-OL.....	40
TABELA II.1 - LIBERAÇÃO DE TERPINEM-4-OL DA FORMULAÇÃO 4 (1%)	60
TABELA II.2 - LIBERAÇÃO DE TERPINEM-4-OL DA FORMULAÇÃO 4 (5%)	60
TABELA II.3 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R ²) DAS FORMULAÇÕES 4 (1 E 5%) DOS MODELOS MATEMÁTICOS DE ZERO ORDEM, PRIMEIRA ORDEM E HIGUCHI.	62

Lista de Abreviaturas

UV: ultravioleta

λ : comprimento de onda

nm: nanômetros

SAXS: espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

kGy: kilograys

PTSH: ácido p-tolueno sulfônico

P: PTSH/Ti

H: H₂O/Ti

TiO₂: dióxido de titânio

ZnO: óxido de zinco

MTT: sal tetrazólico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

FPS: fator de proteção solar

DME: dose mínima eritematosa

HaCaT: queranócitos de pele humana

MRC-5: fibroblastos de pulmão humano

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão bibliográfica	20
2.1. Câncer de pele e a radiação solar	20
2.2. Protetor solar	21
2.3. Fator de Proteção Solar	23
2.4. Dióxido de titânio.....	24
2.5. Citotoxicidade de nanomateriais.....	27
2.6. Sistemas líquido-cristalinos e liberação controlada de ativos	28
2.7. Terpinem-4-ol	30
3. Objetivos	32
4. Materiais e Métodos.....	33
4.1. Materiais	33
4.1.1. Reagentes e utensílios.....	33
4.1.2. Equipamentos.....	34
4.2. Métodos	34
4.2.1. Obtenção do sol e xerogel de TiO ₂	34
4.2.2. Teste de citotoxicidade	35
4.2.2.1. Preparação das amostras	35
4.2.2.2. Cultura de células	35
4.2.2.3. Subcultivo	36
4.2.2.4. Viabilidade celular através do MTT.....	36
4.2.2.5. Viabilidade Celular através do Violeta Cristal Violeta Cristal.....	37
4.2.3. Potencial Zeta.....	38
4.2.4. Obtenção de sistemas líquido-cristalinos	38
4.2.5. Caracterização dos sistemas líquido-cristalinos.....	39
4.2.5.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)	39
4.2.5.2. Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)	39
4.2.6. Incorporação das nanopartículas de TiO ₂ e do terpinem-4-ol	39
4.2.7. Caracterização físico-química das formulações com TiO ₂ e terpinem-4-ol.....	40
4.2.8. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do terpinem-4-ol.....	40
4.2.9. Teste de FPS <i>in vitro</i>	42

4.2.10. Espectroscopia de Reflectância Difusa.....	42
5. Resultados e Discussão	43

CAPÍTULO I - Obtenção de xerogeis de TiO₂

I.1. Obtenção de xerogeis	44
I.2. Teste de Citotoxicidade.....	44
I.3. Potencial Zeta	47

CAPÍTULO II – Obtenção e caracterização de formulações líquido-cristalinas contendo TiO₂ e terpinem-4-ol

II.1. Formulações líquido-cristalinas	49
II.2. Caracterização físico-química dos sistemas líquido-cristalinos	49
II.3. Incorporação de xerogel de TiO ₂ em formulações líquido-cristalinas	51
II.3.1. Caracterização dos sistemas líquido-cristalinos contendo xerogel de TiO ₂	53
II.4. Incorporação de terpinem-4-ol.....	56
II.5. Teste de liberação <i>in vitro</i>	58
II. 5.1. Teste de especificidade	58
II.5.2. Construção da curva analítica	58
II.5.3. Teste de liberação <i>in vitro</i> do terpinem-4-ol.....	59

CAPÍTULO III – Avaliação da capacidade de proteção solar das formulações

III.1. Teste de FPS <i>in vitro</i>	64
III.2. Reflectância difusa	69
III.3. Comparação da atividade fotoprotetora de xerogeis com e sem tratamento térmico ..	76
6. Conclusões.....	82
7. Referências	84

1. INTRODUÇÃO

O câncer mais freqüente no Brasil é o de pele, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores diagnosticados em todas as regiões geográficas do país. A radiação ultravioleta (UV), proveniente do sol, é o seu maior agente etiológico (BRASIL, 2010_c). Principalmente as radiações UVA (faixa de comprimento de onda (λ) entre 320 - 400 nm) e UVB (faixa de λ entre 280 – 320) que atravessam a camada de ozônio podem causar alterações moleculares que danificam o DNA e prejudicam o funcionamento regular da célula, o que provoca o aparecimento do câncer. A radiação UVC se estende na faixa de λ entre 200 e 290nm, entretanto é retida pela camada de ozônio.

Para a prevenção do câncer de pele algumas medidas podem ser tomadas como o uso de chapéu, guarda-sol e o uso freqüente e aplicação adequada de protetor solar com fator de proteção solar (FPS) mínima de 15 (BRASIL, 2007; SÃO PAULO, 2010).

Hoje em dia, é grande a procura por cosméticos que ofereçam vários benefícios com o mínimo esforço. Com um mercado que exige tecnologia avançada em formulações inovadoras, busca-se o desenvolvimento de produtos multifuncionais que atuem tanto no tratamento quanto na estética do consumidor (PATRAVALE e MANDAWGADE, 2008). Formulações cosméticas e farmacêuticas para aplicação tópica são multifacetadas e podem ser desde líquidos, por exemplo, soluções aquosas e suspensões, a semisólidos, como géis e emulsões, até sistemas sólidos, por exemplo, pós e adesivos transdérmicos (OTTO et al., 2009).

Normalmente, os protetores solares são encontrados no mercado na forma de emulsões como cremes e loções, géis e sprays. Algumas formulações podem apresentar estruturas líquido-cristalinas as quais apresentam características atrativas na área cosmética, principalmente, o controle da liberação de ativos incorporados.

Os tensoativos, quando dispersos em água, podem formar uma variedade de agregados micelares sob concentrações e temperaturas críticas, exibindo diferentes tamanhos e geometrias e frequentemente propriedades reológicas como fluidos. Quando as interações intermicelares atingem um nível crítico pode alcançar-se o sistema líquido-cristalino liotrópico ou estado mesomórfico. Os sistemas líquido-cristalinos estão associados com o intermediário dos estados sólidos e líquidos: o mais perfeito arranjo posicional de orientação ordenada do estado sólido, exibindo anisotropia ótica de arranjo desordenado encontrado em líquidos isotrópicos (WANG e ZHOU, 2009). No setor

Eloísa Berbel Manaia

farmacêutico/cosmético uma de suas aplicações é a possibilidade de incorporação de ativos neste sistema. Os sistemas líquido-cristalinos apresentam propriedades diferenciadas como o comportamento reológico, solubilidade e liberação de ativos (OTTO et al., 2009). A microscopia de luz polarizada é o método mais adequado para a primeira identificação de um sistema líquido-cristalino (GAISIN et al., 2010), entretanto, o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é a metodologia mais precisa na caracterização deste sistema.

Os protetores solares podem conter filtros orgânicos e/ou inorgânicos. Os filtros solares inorgânicos mais usados hoje em dia são o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) os quais absorvem, refletem e espalham a radiação UV. Os filtros solares inorgânicos têm características relevantes que os tornam mais vantajosos do que os filtros orgânicos na aplicação em protetores solares: são fotoestáveis e apresentam baixa irritabilidade dérmica, o que justifica seu grande uso em protetores solares infantis (SERPONE et al., 2007). Entretanto, devido ao grande tamanho da partícula do TiO_2 a dispersão em formulações cosméticas é dificultada, ficando com aspecto granuloso e quando espalhada sobre a pele forma um filme branco, sendo de baixa aceitação pelos consumidores. Por isso, as nanopartículas de TiO_2 vem sendo usadas para amenizar estes problemas além de proporcionar uma proteção solar mais efetiva (WANG e TOOLEY, 2011). Uma das maneiras de se obter nanopartículas de TiO_2 é através do processo sol-gel. Este processo se dá por reações de hidrólise sequenciadas por reações de condensação, o que forma partículas coloidais. Utiliza-se como precursor alcóxido solubilizado em solvente orgânico. Através deste processo obtém-se nanopartículas com tamanho e forma controlados, porém o grande desafio é conseguir mantê-las com as mesmas propriedades em meios diferentes, já que elas têm grande tendência em aglomerar-se (FAZIO et al., 2008). O potencial zeta possibilita identificar as cargas elétricas que envolvem a superfície das nanopartículas em diferentes pHs, permitindo dessa forma modular os sistemas contendo essas nanopartículas.

Dependendo dos parâmetros utilizados no processo sol-gel, as nanopartículas de TiO_2 podem apresentar uma área de superfície muito grande, devido ao seu pequeno tamanho e, portanto, precisam ser avaliadas quanto à sua citotoxicidade. Estudos mostram que o risco de saúde que as nanopartículas de TiO_2 apresentam para os humanos é devido a várias características físico-químicas, como a fase do cristal (rutilo, anatase e broquita), o tratamento de superfície, composição, agregação e valor do pH do meio (JIN et al., 2008).

Uma das metodologias *in vitro* que vem sendo utilizada para determinar a citotoxicidade de TiO_2 é avaliação da viabilidade celular através da redução do sal tetrazólico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) pela atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial, transformando o sal amarelo em um cristal de formazana (coloração púrpura) (FUJITA, 2009; JIN, 2008; ZHANG, 2008). Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular é utilizando o Violeta Cristal, o qual quantifica proteínas e estas estão relacionadas à quantidade de células vivas (CHIBA et al., 1998).

Os sistemas líquido-cristalinos que incorporam nanopartículas de TiO_2 e ativos com ação anticancerígena podem ser usados como sistemas multifuncionais: protegem a pele contra a radiação ultravioleta e liberam de forma controlada esses ativos. Desta forma, o fator de proteção solar e a avaliação da cinética de liberação de ativos se tornam ferramentas importantes para caracterizar esses sistemas.

O fator de proteção solar (FPS) é a razão entre a dose mínima eritematosa (DME) na pele protegida por um protetor solar e a DME na mesma pele quando desprotegida (BRASIL, 2010_b) e deve ser determinado *in vivo* para se registrar o produto, e pode ser *in vitro* na fase de desenvolvimento do produto. Devido ao baixo custo, rapidez e ausência de problemas éticos por não envolver seres humanos, o teste *in vitro* vem sendo bastante utilizado (SCALIA et al., 2010). O método se baseia na transmitância ou absorbância da amostra aplicada no substrato. A curva obtida neste experimento fornece dois atributos relevantes como a amplitude da curva de transmitância/absorbância que está diretamente relacionada à intensidade da proteção contra a radiação UV e o formato da curva que determina o comprimento de onda crítico, o qual se relaciona a região espectral de proteção (GAROLI et al., 2009).

O TiO_2 atua como protetor solar espalhando, refletindo e/ou absorvendo a radiação ultravioleta. Sendo assim, a espectroscopia de reflectância difusa é uma ferramenta utilizada tanto para analisar a atividade fotoprotetora do TiO_2 em comprimentos de onda da região do espectro UV, quanto para avaliar sua transparência/opacidade em comprimentos de onda da região Visível (Vis).

Há uma ampla variedade de ativos com ação anticancerígena. O terpinem-4-ol é um dos componentes em maior concentração do óleo da *Melaleuca alternifolia*, um arbusto nativo da Austrália, também chamado de Tea Tree Oil (TTO) (KIM et al., 2004). Apresenta atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além de

se mostrar ativo contra alguns tipos de câncer como pulmão, mama, próstata e também o de pele (CALCABRINI, 2004; GREAY, 2010; LIU, 2009). Devido a atividade antioxidante e a atividade contra o câncer de pele, pode prevenir a formação do câncer de pele e ser usado no tratamento deste.

Para sistemas de uso tópico, a liberação controlada de ativos pode ser estudada através de teste de liberação *in vitro*. Este teste permite identificar a cinética de liberação do ativo e podendo assim sugerir a forma de aplicação destes sistemas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer de pele e a radiação solar

Uma das doenças mais frequentes no Brasil e em países onde a incidência da radiação ultravioleta é alta é o câncer de pele. O câncer de pele do tipo melanoma é o câncer mais grave por poder desencadear a metástase, porém se ele é diagnosticado em seu estágio inicial, tem grande chance de atingir a cura (BRASIL, 2010_c). O melanoma começa quando gradualmente os melanócitos se tornam mutados, instáveis e dividem-se sem controle ou ordem. Essas células podem invadir e destruir outras células a sua volta (KATTEN MUCHIN ROSENMAN LLP, 2007), por isso o melanoma tem um grande potencial de metástase, podendo ser fatal (BRASIL, 2010_a). Podem aparecer de repente ou podem desenvolver-se a partir ou em torno de pintas (KATTEN MUCHIN ROSENMAN LLP, 2007). Apresenta-se como uma mancha de contornos irregulares, em diferentes tons de castanho e negro (BRASIL, 2010_a). Para o tratamento deste tipo de enfermidade podem ser utilizadas a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, depende do tipo e do estágio da doença (SÃO PAULO, 2010). Por isso são realizados exames histopatológicos para que se determine a profundidade da invasão e as eventuais possibilidades de metástase (KATTEN MUCHIN ROSENMAN LLP, 2007).

O câncer de pele do tipo não-melanoma é o mais comum e pode ser de diferentes linhagens celulares como basocelular, epidermoide, espinocelular, entre outros. No Brasil, o câncer de pele melanoma foi responsável por 1303 mortes em 2008 e o câncer de pele não-melanoma por 1296 mortes em 2007 (BRASIL, 2010_c). Nos Estados Unidos da América em 2006 mais de 2 milhões de pessoas receberam tratamento para o câncer de pele não melanoma (AMERICAN, 2010). A quimioterapia tópica quando usada em combinação com cirurgia de excisão do câncer de pele ou como terapia única é uma opção segura, não muito cara e conveniente para o tratamento do câncer de pele. O imiquimod, modulador imunológico e 5-fluorouracil, inibidor de timidilato sintase, tem sido usado com sucesso no tratamento de carcinoma de células basais superficiais e de queratoses actínicas (GREAY et al., 2010).

A exposição à radiação UV proveniente do sol é uma das principais causas etiológicas do câncer de pele (BRASIL, 2010_a). Dentre elas destacam-se a radiação UVA e UVB, que atravessam a camada de ozônio (WANG et al., 2010), induzindo o câncer de pele (DUALE et al., 2010). A radiação UVA é a responsável por provocar o bronzeamento da pele e é subdividida em UVAI (faixa de comprimento de onda entre

320-340nm) e UVA II (faixa de comprimento de onda entre 340-400nm). Além disso, a radiação UVA penetra em regiões mais profundas da pele podendo atingir a derme, promover o envelhecimento da pele, pigmentação e provocar danos como diminuição de colágeno e de vasos sanguíneos, alterações no tecido da derme e fotossensibilização da pele. A radiação UVB, apesar de também ser pigmentógena, por ter seu comprimento de onda estendido entre 290-320 nm, apresenta energia mais elevada sendo responsável por danos imediatos a pele, os quais resultam em eritemas e queimaduras solares (FLOR et al., 2007; JAIN e JAIN, 2010). O mecanismo molecular pelo qual a radiação UV desencadeia o câncer de pele é causando danos no DNA direta ou indiretamente, formando dímeros de pirimidina, fotoprodutos, espécies reativas de oxigênio (ERO) ou ainda promovendo uma parada do ciclo celular, depressão imunológica, apoptose celular e mudanças transcricionais (KLUG et al., 2010).

A camada de ozônio retém aproximadamente 100% da radiação UVC (200-290 nm) e 90% da radiação UVB e toda a radiação UVA atinge a superfície terrestre (WANG, 2010). Embora a radiação UVC tenha algumas propriedades desejáveis, como atividade germicida, existem relatos que revelam que a radiação UVC pode ser prejudicial para a pele por apresentar potencial atividade mutagênica e carcinogênica (JAIN e JAIN, 2010).

2.2. Protetor solar

Um protetor solar é composto por moléculas orgânicas e/ou inorgânicas com atividade fotoprotetora incorporadas em uma base cosmética e é utilizado para proteger a pele da radiação ultravioleta proveniente do sol. O protetor solar pode ser apresentado comercialmente na forma de creme, gel, spray ou outro produto tópico (JAIN e JAIN, 2010). Há variadas bases cosméticas utilizadas para protetores solares, entretanto a emulsão vem sendo mais utilizada pela facilidade de incorporação dos ativos e filtros solares (OTTO et al., 2009).

Além de prevenir o câncer de pele, o protetor solar pode ser utilizado para atenuar e diminuir muitos processos dermatológicos causados pela radiação solar como sinais de idade, formação de rugas, aparecimento de pigmentação, dilatação de vasos sanguíneos e perda de colágeno (DUALE et al., 2010; SEITE et al., 2000). Há dois grupos de ativos que atuam como filtro solar: inorgânico e orgânico. Os filtros inorgânicos são basicamente o dióxido de titânio e o óxido de zinco os quais atuam refletindo, espalhando e ou absorvendo a radiação solar que atinge a pele. Os filtros

solares orgânicos são geralmente compostos aromáticos com um grupo carbonila que ao receberem a energia dos fótons da radiação UV, podem agir de três maneiras: (i) sofrendo mudanças conformacionais moleculares, (ii) liberando a energia na forma de calor ou (iii) emitindo radiação em altos comprimentos de onda (ANTONIOU, 2008; KISS, 2008). Esse modo de ação das moléculas orgânicas fotoprotetoras é reversível, portanto, a mesma molécula pode realizar várias vezes sua função. Exemplos de classes de filtros solares orgânicos são os salicilatos, cinamatos, benzofenonas, antranilatos, dibenzoilmetanos, p-aminobenzoatos, entre outros (ANTONIOU, 2008; JAIN, 2010).

Tanto os filtros solares orgânicos quanto os inorgânicos têm capacidade de proteger a pele das radiações UVA e UVB. Entretanto, nem todos os filtros orgânicos absorvem ambas as radiações, predominando mais sua proteção na faixa UVB. Além disso, os filtros inorgânicos apresentam algumas vantagens de grande relevância sobre os orgânicos: são fotoestáveis, enquanto que alguns filtros orgânicos, por exemplo, avobenzona, são fotolábeis; apresentam baixa taxa de alergenicidade e sensibilização (WANG et al., 2010), o que justifica sua grande utilização em protetores solares infantis (SERPONE et al., 2007) pois provocam menos irritação dérmica que os filtros orgânicos (CHOI, 2011). Além disso, ao absorver os fótons da radiação UV, os filtros orgânicos liberam radicais livres e como consequência causam danos ao colágeno, elastina ou DNA. Portanto, o uso freqüente de protetores solares contendo filtros orgânicos pode provocar reações adversas que devem ser levadas em consideração (JAIN e JAIN, 2010).

Há a preocupação do uso de protetor solar causar redução da produção de Vitamina D a níveis insuficientes uma vez que essa importante vitamina precisa da radiação UVB recebida pela pele para se transformar em pré-vitamina D₃ e então seguir pelo corpo humano onde sofrerá outras reações químicas até ser transformada em calcidiol nos rins. Os estudos concluíram que a produção da Vitamina D não é prejudicada por vários motivos: (i) os protetores solares não bloqueiam toda a radiação UV, (ii) não é real pensar que todas as regiões do corpo expostas a radiação solar estão protegidas pelo protetor solar e o mais relevante (iii) a população não utiliza a quantidade correta (2 mg por cm² de pele) nem da maneira correta (repassar a cada 2 horas, ou após suar e se banhar) para que se tivesse o FPS desejado (NORVAL e WULF, 2009).

2.3. Fator de Proteção Solar

Os protetores solares vêm sendo desenvolvidos para proteger a pele da formação de eritemas e também, a longo prazo, prevenir o envelhecimento da pele e aparecimento do câncer de pele. Por isso, vários métodos *in vivo* e *in vitro* foram elaborados a fim de mostrar a eficiência dessa linha de produtos (HEINRICH et al., 2004). Um desses métodos é a determinação do FPS dos protetores solares, um teste exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o registro desses produtos. A ANVISA exige para fins de registro que estes testes sejam *in vivo*, podendo seguir duas metodologias: COLIPA/JCIA/CTFA-AS - Teste internacional de FPS, 2006 e o método proposto pela monografia final na Citação do Registro Federal 21, parte 352 da Food and Drug Administration (FDA) (BRASIL, 2010_b). Embora o método *in vivo* seja o mais próximo da realidade por simular o uso dos produtos, se gasta muito tempo para realizá-lo, o custo é maior que o *in vitro* e ainda há toda uma preocupação com a parte ética da pesquisa que envolve seres humanos (SHEU et al., 2003).

Desde 1972 os métodos *in vitro* vêm sendo elaborados a fim de determinar o espectro de transmissão dos protetores solares, o FPS e também a faixa de proteção contra a radiação UV. A maior dificuldade destes testes é encontrar um substrato para aplicação das amostras de protetor solar que ao mesmo tempo permita a transmissão da radiação ultravioleta de interesse (290 - 400 nm) e seja similar às irregularidades da pele, para se obter um resultado mais próximo do valor do FPS determinado *in vivo* (DIFFEY e ROBSON, 1989). Hoje em dia há várias opções de substratos para realizar este teste, como polimetil-metacrilato (PMMA), Vitro-Skin®, Transpore 3M, placa de quartzo e teflon. Estudos indicaram que Vitro-Skin®, Transpore 3M e placa de quartzo são preferíveis na determinação do FPS *in vitro* por serem mais comparáveis aos resultados de FPS *in vivo* (GAROLI et al., 2009).

Atualmente os métodos que têm sido usados na determinação do FPS utilizam a transmitância difusa com esfera de integração. A radiação que incide sobre a amostra do protetor solar pode ser absorvida e espalhada pela formulação, o restante da radiação é transmitida em diversos ângulos (distribuição hemisférica dos raios). Com a esfera de integração consegue-se medir a transmitância hemisférica total dos raios devido ao material branco e de alta refletividade que a esfera é revestida. Assim, o fotodetector instalado dentro da esfera consegue captar a radiação proporcional a que está sendo produzida nas paredes da esfera. Essa geometria é chamada de normal/difusa e o inverso

dela é recíproco, sendo a difusa/normal utilizada no Labsphere, um dos equipamentos mais utilizados na determinação do FPS *in vitro* (SPRINGSTEEN et al., 1999).

2.4. Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio (TiO_2) é um filtro solar inorgânico que atua refletindo, espalhando e/ou absorvendo a radiação ultravioleta, protegendo o DNA das células da pele dos danos causados por tal radiação. O TiO_2 é considerado seguro em concentrações de até 25% em peso de uma formulação, tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quanto pela monografia da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) (SADRIEH et al., 2010).

Além de seu uso em protetor solar, pode ser aplicado em revestimentos para janelas autolimpantes (SAYES et al., 2006), implantes ortopédicos, produtos plásticos (KISS et al., 2008) e em nanoescala tem sido utilizado em muitos produtos de consumo como tintas, têxteis, eletrônicos e produtos farmacêuticos. Apresenta atividade fotocatalítica e, devido a essa propriedade, vem sendo utilizado no tratamento de poluentes, águas residuais e tem sido até estudado como agente destruidor de células tumorais (JACOBS et al., 2010).

O TiO_2 é polimórfico, sendo denominadas suas formas cristalinas de anatase, rutilo e broquita (SADRIEH et al., 2010), porém somente a rutilo e anatase são relevantes para formulações de protetor solar (SERPONE et al., 2007). Quando as partículas do pó são sintetizadas em tamanhos inferiores a 10 nm, o TiO_2 está em sua forma polimórfica mais fotoativa em relação a atividade fotocatalítica, anatase. Nanocristais maiores podem ser obtidos em suas formas anatase ou rutilo puras, ou uma mistura particular fotoativa de ambos (SAYES et al., 2006).

É ampla a faixa de proteção que o TiO_2 oferece, se estendendo da região UVA II até UVB (290-400nm) (SERPONE et al., 2007). Já o ZnO protege principalmente a extensão UVA (320-400nm) do espectro (POPOV et al., 2008). Por isso o ZnO tende a ser utilizado para suplementar atenuadores UVB já existentes e também em produtos que provém proteção de amplo espectro para o dia todo, enquanto que o TiO_2 pode ser utilizado sozinho por oferecer proteção de amplo espectro.

Sabe-se que uma das características não favoráveis destes óxidos quando utilizados em formulações de protetor solar é que eles formam um filme branco sobre a pele. Isso se deve ao fato do tamanho de suas partículas refletirem a radiação UV-Visível devido aos altos índices de refração, sendo 2,6 do TiO_2 e 1,9 do ZnO. Portanto,

muitas indústrias e fabricantes estão seguindo a alternativa de micronizar ou submicronizar (partículas nanométricas) estes filtros inorgânicos, diminuindo o tamanho de suas partículas, tornando-as com aspecto sensorial desejável para aplicação em protetores solares comerciais, o que potencializa a absorção da radiação e facilitam a incorporação em emulsões (KISS, 2008; SADRIEH, 2010; SERPONE, 2007; WANG, 2010).

Entretanto, existe a preocupação com o tamanho das partículas, pois o comprimento de onda em que o TiO_2 atenua está em função do tamanho da superfície da partícula, seguindo assim a lei de Mie (SADRIEH et al., 2010). Estudos seguindo a teoria de Mie e utilizando a metodologia Monte Carlo mostraram que o TiO_2 tem uma ação protetora melhor em comprimento de onda 290 nm (UVB) quando está entre 20 a 100 nm, já para comprimentos de onda de 350 e 400 nm (UVA), está entre 80 - 160 nm e 120 - 180 nm, respectivamente (POPOV et al., 2008). A lei de Mie é uma explicação mais geral da difusão da radiação. Já o espalhamento de Rayleigh correlaciona o raio da partícula com a intensidade do espalhamento dependendo do comprimento de onda. A intensidade de espalhamento da radiação é inversamente proporcional a quarta potência do comprimento de onda. Portanto, em comprimento de onda abaixo de 400 nm, quanto mais finas as partículas, melhor será a dispersão da radiação UV. E partículas de tamanho variando entre 15 e 50 nm conseguem ter aparência transparente devido à baixa potência de dispersão da radiação UV-Vis (ALLEN et al., 2002).

Uma das maneiras de se obter nanopartículas de dióxido de titânio é através do processo sol-gel. Sol é definido como uma dispersão coloidal (partículas de dimensão entre 1 e 100 nm) em um fluido estável e gel é caracterizado por uma estrutura rígida de partículas coloidais a qual imobiliza a fase líquida em seu interior. As reações químicas que ocorrem no processo sol-gel são hidrólises seguidas de condensações. Os precursores utilizados são geralmente alcóxidos dissolvidos em solventes orgânicos (BRINKER e SCHERER, 1990).

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa tiveram sucesso na obtenção de nanopartículas de TiO_2 de superfície modificada através de sistemas sol-gel termoinduzidos, utilizando isopropóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$) diluído em isopropanol, utilizando o ácido para-tolueno sulfônico (PTSH) como modificador de superfície (KAMINSKI et al., 2010_a).

Os resultados revelaram que dependendo das razões molares de H_2O/Ti e $PTSH/Ti$, obtem-se sistemas coloidais com os comportamentos distintos indicados na Figura 1, ou seja: sol termoestável, sol-gel termorreversível e gel irreversível. A partir dos dados coletados diferentes espécies de Ti puderam ser observadas dependendo da formulação. Diversas composições da região termorreversível foram estudadas sistematicamente e os resultados indicam a possibilidade de controlar o tamanho e a agregação das partículas, além da temperatura em que se passa a transição sol-gel (KAMINSKI et al., 2010_a).

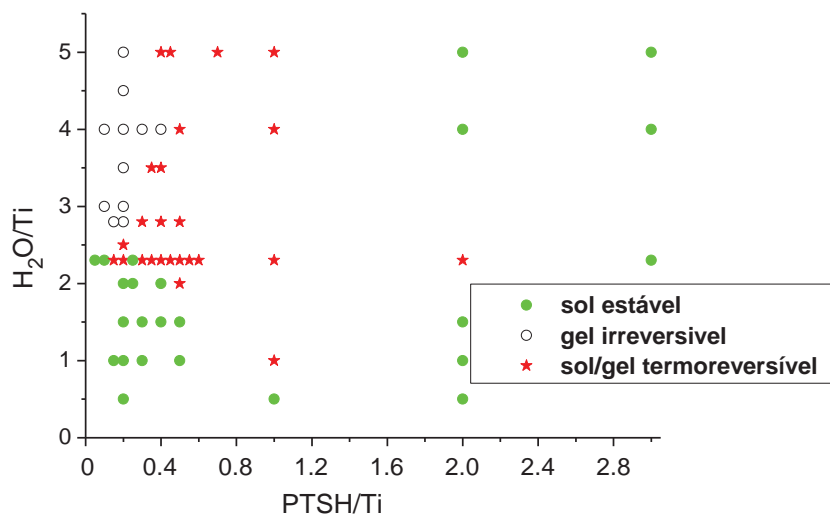


Figura 1. Diagrama de formação do sol e do gel, considerando as razões de $PTSH/Ti$ e de H_2O/Ti (KAMINSKI et al., 2010_a).

O comportamento transparente/turvo destes géis tem ligação direta com o tamanho e agregação das partículas e com as cargas superficiais. A partir das medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), pudemos comprovar a possibilidade de obter géis com partículas de tamanho maior que 30 nm e transparentes, em uma faixa de temperatura de 20-60°C (KAMINSKI et al., 2010_b). Esses resultados indicam que esse material permitirá o desenvolvimento de dispositivos na forma de gel com potencial aplicação na área de cosmetologia e de medicina, pois podemos obter

nanopartículas de TiO₂ transparentes, com tamanho e cargas de superfície controlados, em uma faixa de temperatura próxima à corporal possibilitando sua utilização como filtros solares, por exemplo.

2.5. Citotoxicidade de nanomateriais

O TiO₂ e o óxido de zinco na forma de nanomateriais são ingredientes chaves adicionados em formulações de protetor solar para proteger a pele contra os danos causados pela radiação ultravioleta (UV) (ZHANG et al., 2008). Como as nanopartículas têm aplicação em seres humanos, o estudo de sua toxicidade vem ganhando grande atenção. Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas de TiO₂ tem várias rotas para entrar no corpo humano: inalação (trato respiratório), ingestão (trato gastrointestinal), penetração dérmica (pele), entre outros (JIN et al., 2008). Buscam-se respostas celulares e eventos moleculares *in vitro* pois é a maneira mais efetiva de avaliar o comportamento toxicológico de nanopartículas ultrafinas, além de não precisar utilizar animais para esta avaliação (FUJITA et al., 2009).

Há estudos *in vitro* utilizando fibroblastos da pele humana para avaliar a relação entre o tamanho das nanopartículas, os tipos cristalinos de titânio e sua citotoxicidade (SAYES et al., 2006). Outros estudos utilizaram fibroblastos de tecido subcutâneo de ratos para avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de TiO₂ em solução aquosa (JIN et al., 2008). Outros pesquisadores tentaram elucidar a relação entre nanopartículas de TiO₂ anatase de diversos tamanhos em queratinócitos da pele humana (FUJITA et al., 2009). A metodologia comum a todos estes estudos é a utilização do sal MTT para avaliar a atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial e dessa maneira obter a viabilidade celular diante do TiO₂.

Há vários ensaios *in vitro* utilizados para avaliar os efeitos citotóxicos de substâncias químicas em culturas celulares. Além do MTT, o violeta cristal, vermelho neutro e azul de tripan são métodos utilizados para analisar a viabilidade celular (CHIBA, 1998; MICKUVIENE, 2004). O violeta cristal é um método simples e reprodutivo baseado na determinação colorimétrica de células viáveis coradas (CHIBA et al., 1998). O violeta cristal cora principalmente o núcleo celular onde há maior concentração de proteínas (KUENG et al., 1989).

2.6. Sistemas líquido-cristalinos e liberação controlada de ativos

Devido à estrutura molecular anfifílica dos tensoativos, eles podem ter a tendência de agregação e formar estruturas de associação anfifílica, por exemplo, micelas e estruturas líquido-cristalinas liotrópicas em fase aquosa ou oleosa. Essa estrutura de associação pode também ser formada em emulsões com excesso de moléculas de tensoativo, quando mais tensoativo está presente do que o necessário para formar a monocamada na interface água-óleo e ou óleo-água. Neste caso, pode haver a formação de micelas ou vesículas formadas em solução, as quais aparecem isotrópicas e transparentes e sistemas líquido-cristalinos liotrópicos que formam uma fase organizada e muitos deles exibem atividade ótica anisotrópica. As fases do sistema líquido-cristalino também podem ser chamadas de mesofases e as moléculas que as formam são denominadas de mesógenas (OTTO et al., 2009).

Dependendo de como a transição de fase do estado líquido-cristalino é causada ele pode ser denominado de termotrópico, quando causado por temperatura, ou de liotrópico quando é causado por alteração da composição. Como solventes estão presentes em emulsões, a formação do último é mais importante em emulsões cosméticas e farmacêuticas (OTTO et al., 2009).

Nas últimas décadas, extensas pesquisas em diagramas de fases têm estudado os sistemas líquido-cristalinos liotrópicos, as estruturas mais comuns e as propriedades específicas de materiais nanoestruturados para serem bem caracterizados. As três fases de sistemas líquido-cristalinos típicas são: lamelar (unidade lamelar), hexagonal (unidade cilíndrica) e cúbico (unidade esférica) (OTTO et al., 2009).

Sistema líquido-cristalino lamelar consiste em bicamadas alternadas de moléculas ordenadas de tensoativo e de solvente. Os tensoativos nas bicamadas são organizados como um caminho que as cadeias hidrofóbicas do tensoativo são o centro da lamela e a parte hidrofílica do tensoativo está em contato com a camada de solvente. Essa categoria de materiais tem uma vasta aplicação, na ciência de materiais, terapia gênica e veículos farmacêuticos (WANG e ZHOU 2009).

A fase hexagonal consiste em micelas empacotadas em arranjo hexagonal e são separadas por uma região contínua de água. Ela pode ser classificada em fase hexagonal normal, onde o cilindro de tensoativo empacotado hexagonalmente está envolto por água e a fase hexagonal reversa, onde os cilindros de tensoativos estão com água em seu interior e empacotados hexagonalmente envolvidos por uma fase oleosa contínua (TIDDYG, 1980).

A fase cúbica, também conhecida como fase isotrópica viscosa, é formada por micelas normais (fase contínua polar) ou reversas (fase contínua apolar) empacotadas em arranjo cúbico. Não é birrefringente quando observada em microscópio de luz polarizada como as fases lamelar e hexagonal (TIDDYG, 1980).

Os tensoativos formam multicamadas ao redor da gota de emulsão, diminuindo a energia de van der Waal's e aumentando as barreiras reológicas contra a coalescência (PATRAVALE et al., 2008). O aparecimento de cristal líquido como uma terceira fase de uma emulsão aumenta a viscosidade e estabilidade da emulsão. Há diferentes modos de ação: os tensoativos podem se organizar ao redor das gotas dispersas atuando como uma barreira contra a coalescência e/ou pode estender a rede tridimensional em uma fase contínua reduzindo a mobilidade das gotas da emulsão (OTTO et al., 2009).

As fases do cristal líquido nas emulsões não consistem somente de moléculas de tensoativos, mas também de água e óleo incorporados, assim como ingredientes ativos. Os ingredientes ativos podem interagir com a fase líquido-cristalino e podem ser incorporados tanto na camada polar quanto na apolar, dependendo da lipofilicidade deles (OTTO et al., 2009). Materiais lipofílicos quando incorporados em matrizes líquido-cristalinas podem ser protegidas da fotodegradação e da degradação térmica (PATRAVALE et al., 2008).

Outra possibilidade de incorporação de ativos nas camadas é a inclusão entre as moléculas de tensoativo. A incorporação de ativos no cristal líquido pode aumentar sua solubilidade assim como afetar no parâmetro de empacotamento das moléculas de tensoativo com conseqüências na transição de fase. Além disso, a transição de fase pode resultar em mudanças de propriedades importantes do veículo como comportamento reológico, estabilidade, solubilidade e liberação (OTTO et al., 2009). A estrutura líquido-cristalina pode atuar como uma barreira de difusão do fármaco e conseqüentemente controlar a sua liberação (FARKAS et al., 2000).

Estudos observaram que a taxa de liberação de ativos é muito menor em emulsões contendo estruturas líquido-cristalinas do que em emulsões sem este componente estabilizador. Este efeito é devido à estrutura líquido-cristalina que é em multicamadas ao redor da gota, reduzindo efetivamente o transporte interfacial do ativo dissolvido entre as gotas (PATRAVALE et al., 2008).

2.7. Terpinem-4-ol

A pesquisa em produtos bioativos extraídos de óleos essenciais vem crescendo cada vez mais devido às propriedades apresentadas por muito deles como atividade antioxidante, antifúngica, anticancerígena, entre outras. Um óleo que vem sendo muito estudado quanto as suas propriedades farmacológicas é o Tea tree oil (TTO) (KIM et al., 2004).

O TTO é extraído da planta nativa da Austrália *Melaleuca alternifolia* da família *Myrtaceae* e é uma mistura de alcoóis ternários e de terpenos, sendo os principais terpinem-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno, α -terpineol, α -terpinoleno, 1,8-cineol, etc. Como há uma variedade de compostos nesse óleo, há uma série de padrões que tenta defini-los e limitá-los porque a variação pode ser devida às condições de plantio dessa espécie. Hoje em dia há um padrão internacional regularizador ISO 4730 “Óleo de *Melaleuca* tipo terpinem-4-ol” que define um máximo e/ou mínimo de 14 compostos. O terpinem-4-ol deve estar no mínimo na concentração de 30 % e o limoneno no máximo a 15% e a procura pelo óleo de TTO é sempre por maiores concentrações de terpinem-4-ol, devido as suas ações antimicrobianas, efeitos antiinflamatórios, entre outros e por menores concentrações de 1,8-cineol que se mostra causador de alergia. Dados publicados mostram que o TTO causa irritação da pele somente em altas concentrações e as reações alérgicas aparecem em indivíduos com pré-disposição e a causa provavelmente é a presença de muitos compostos que sofrem oxidação através da exposição a luz e/ou ar (HAMMER, 2006; KIM, 2004).

A Figura 2 apresenta a estrutura química do terpinem-4-ol. Além das ações farmacológicas já citadas, o terpinem-4-ol tem mostrado atividade antioxidante. Sendo assim, pode ser usado na redução de doenças crônicas (danos no DNA, mutagênese, carcinogênese) e na inibição de crescimento de bactérias patogênicas que estão associadas a propagação de radicais livres em sistemas biológicos. (KIM et al., 2004). Em relação ao câncer de pele, o terpinem-4-ol se mostrou efetivo contra o crescimento de células de melanoma em teste *in vitro* (CALCABRINI et al., 2004), apresentou atividade antiproliferativa significativa contra células tumorais e quando aplicado topicamente inibiu o crescimento agressivo de tumor subcutâneo em camundongos imunodeprimidos (GREAY et al., 2010).

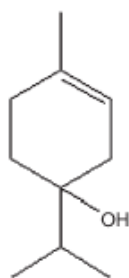


Figura 2. Estrutura química do terpinem-4-ol (REICHLING et al., 2006).

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO_2 obtidos através do processo sol-gel com tamanho de partículas controlado, capazes de agir como eficientes protetores solares e simultaneamente liberar de forma controlada princípios ativos capazes de prevenir ou tratar o câncer de pele.

Para alcançar o objetivo as seguintes ações foram tomadas:

- Obtenção de nanopartículas de TiO_2 ;
- Avaliação da citotoxicidade e do potencial zeta das nanopartículas de TiO_2 ;
- Obtenção de formulações líquido-cristalinas;
- Incorporação de nanopartículas de TiO_2 em formulações líquido-cristalinas;
- Obtenção de formulação de protetor solar com TiO_2 com aspecto transparente;
- Caracterização físico-química dos sistemas de interesse;
- Avaliação da proteção solar de formulações de interesse;
- Incorporação de terpinem-4-ol em sistemas líquido-cristalinos contendo nanopartículas de TiO_2 ;
- Determinação do perfil de liberação do princípio ativo de escolha.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes e utensílios

- Ácido para tolueno sulfônico (PTSH) – Vetec Química Fina
- Isopropóxido de titânio ($\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$) – Sigma Aldrich
- Isopropanol – Qhemis
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – Sigma Aldrich
- Fosfato de sódio – J.T.Baker
- Solução de Antibiótico e Antimicótico estabilizada – Sigma Aldrich
- Kanamicina – Sigma Aldrich
- Hepes – J.T.Baker
- Bicarbonato de sódio – Qhemis
- Soro fetal bovino (SFB) – Cultilab
- Tripsina 0,5% EDTA – Gibco
- Peróxido de hidrogênio – Merck
- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) – Sigma Aldrich
- Violeta cristal – Sigma Aldrich
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Sigma Aldrich
- Etanol - Qhemis
- Álcool cetílico etoxilado e propoxilado - Procetyl AWS – Volp
- Ceteth-10 (Brij56) – Sigma Aldrich
- Palmitato de isopropila – Audaz Farmacopéia Fina
- Hidróxido de sódio – Qhemis
- Ácido Cítrico Monohidratado - Synth
- Álcool etílico absoluto - J.T.Baker
- Placa de quartzo
- Fita transpore 3M
- (-)- Terpinem-4-ol (Sigma Aldrich)

4.1.2. Equipamentos

- Câmera seca – Nitrogen dry Box by Plas Labs Lansing, MI, USA
- Estufa – Nova Ética
- Agitador magnético – Corning PC-420 Stirrer/Hot Plate
- Rotoevaporador – R-124 Büchi
- Ultrassom Sonics & Materials – Vibra Cell™
- Centrífuga – Fanem
- Incubadora de CO₂ TE-399 Tecnal
- Leitor de placas (iMark Microplate Absorbance Reader, modelo 168-1135, Bio-Rad, USA).
- Agitador Mecânico – Marconi
- Labsphere UV-2000S Ultraviolet Transmittance Analyser
- Espectrofotômetro Cary – 500 Scan – UV-Vis-NIR – Varian - Acessório Harrick para reflectância difusa
- Mufla 3P-S – EGD
- Ultrassom Sonics & Materials – Vibra Cell™
- Agitador Mecânico – Marconi
- Microscópio de luz polarizada Olympus BX41 com Câmara acoplada QColor3 Olympus America INC

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção do sol e xerogel de TiO₂

Para a preparação das suspensões de TiO₂ foi utilizado água Milli-Q, ácido paratolueno sulfônico (PTSH), isopropóxido de titânio (Ti(OⁱPr)₄) e isopropanol. Primeiro preparou-se uma solução aquosa de PTSH e posteriormente preparou-se na câmara seca uma solução de Ti(OⁱPr)₄ em isopropanol. Verteu-se a solução de PTSH na solução de Ti(OⁱPr)₄, sob agitação magnética. Tampou-se o frasco e este ficou em envelhecimento na estufa a 60°C por 18 horas.

As quantidades de água e PTSH foram calculadas a partir da razão molar em relação ao Ti, o qual é mantido sempre a uma concentração de 0,5 mol/L. Foram preparadas as seguintes formulações, sendo P a razão molar de PTSH/Ti e H a razão molar de H₂O/Ti: P0,05H2,3, P0,05H1, P0,1H2,3, P0,2H0,5, P0,2H1, P0,2H2,3, P0,2H3, P0,2H5, P0,5H1 e P2H2,3.

Para a obtenção dos pós (xerogeis), o sol foi seco em estufa a 60°C ou 100°C até a evaporação de todo solvente. Este pó obtido foi triturado utilizando pistilo e almofariz. A Figura 2 representa esquematicamente a obtenção do xerogel através do processo sol-gel.

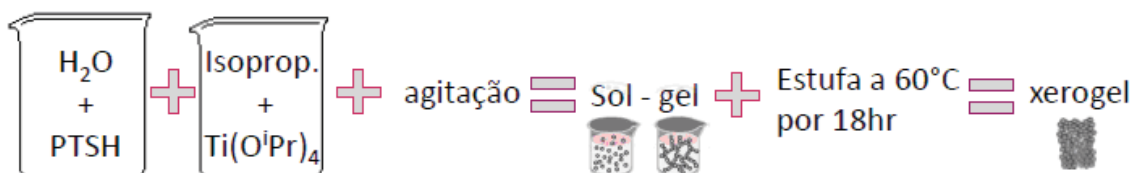


Figura 1 - Esquema de obtenção de xerogel de TiO₂ através do processo sol-gel.

Foi realizado um tratamento térmico de quatro xerogeis (P0,05H1, P0,5H1, P0,2H2,3 e P2H2,3) a fim de avaliar diferença na atividade fotoprotetora. Submeteram-se os xerogeis a 450°C durante duas horas na mufla e resfriou-se a temperatura ambiente.

4.2.2. Teste de citotoxicidade

4.2.2.1. Preparação das amostras

Foram escolhidas seis formulações de xerogeis: variou-se a quantidade de ácido para a mesma razão de hidrólise (P0,05H2,3 e P2H2,3) e também variou-se a razão de hidrólise para a mesma quantidade de ácido (P0,2H0,5, P0,2H2,3, P0,2H3, P0,2H5). Os pós foram redispersos a 15% (p/v) em água Milli-Q com ajuda do ultrassom. Estas amostras foram esterilizadas através de energia ionizante com uma dose de 20 quilogray (kGy) pela empresa EMBRARAD. Estas suspensões foram posteriormente diluídas em tampão fosfato (PBS) para o preparo da solução mãe e depois diluídas em meio de cultura DMEM a 3,125, 6,25, 12,5, 25 e 50% de TiO₂ para preparo da solução teste.

4.2.2.2. Cultura de Células

Foram utilizadas duas linhagens de células: queratinócitos de pele humana – HaCaT e fibroblastos de pulmão humano – MRC-5. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo, contendo meio de cultura DMEM pH 7,2 - 7,4 suplementado com bicarbonato de sódio, Hepes, antibióticos e antimicóticos (penicilina, estreptomicina, anfotericina B e kanamicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As garrafas foram mantidas a 5% CO₂ e temperatura de 37°C na incubadora de CO₂.

4.2.2.3. Subcultivo

Quando a monocamada celular apresentou-se em 70% de confluência, as células foram lavadas com solução de Hanks (mistura de sais enriquecidas de aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular) e submetidas à tripsina 0,5% para desprendimento das garrafas de cultivo. Adicionou-se o mesmo volume de meio DMEM suplementado com 10% SFB para neutralização da tripsina. As células foram coletadas em tubo de centrifuga e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspenso em meio de cultura novo; as células foram devolvidas para a garrafa de cultivo. Este procedimento foi realizado para as duas linhagens de células e repetido, no mínimo, até alcançar a terceira passagem.

4.2.2.4. Viabilidade celular através do MTT

As células HaCaT e MRC-5 (2×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas e tratadas com 100 μ L das soluções teste em diferentes concentrações por 24 horas. As soluções testes foram removidas e colocou-se 10 μ L do corante tetrazólico MTT em cada poço. As placas foram incubadas por quatro horas em contato com MTT a 5% CO_2 e temperatura de 37°C. A atividade da desidrogenase mitocondrial reduziu o MTT amarelo para um sal de formazana roxo insolúvel, o qual foi solubilizado em isopropanol e sua absorvância foi lida a 540 nm no leitor de placas.

Neste método, as células que permaneceram vivas após o contato com o TiO_2 conseguem reduzir o sal MTT através da enzima presente na mitocôndria (organela responsável pela respiração celular). Sendo assim, através da quantificação do cristal de formazana de cor púrpura pela espectroscopia de absorção UV-Visível é possível quantificar a porcentagem de células vivas.

Foi utilizado como controle negativo o meio de cultura DMEM, como controle positivo o peróxido de hidrogênio a 20 mM e o branco é o meio de cultura DMEM sem a presença de células. Fez-se outro branco somente com a solução teste para eliminar qualquer tipo de interferência da absorvância do TiO_2 .

Foram realizados três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas. A viabilidade celular dos tratamentos foi expressa em relação ao controle negativo.

4.2.2.5. Viabilidade celular através do Violeta Cristal

As células HaCaT e MRC-5 (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas e tratadas com 100 μL das soluções teste em diferentes concentrações por 24 horas. As soluções testes foram removidas e as células foram coradas utilizando 100 μL de solução 0,2% violeta cristal em 2% etanol. O corante foi desprezado e as placas foram lavadas em água corrente. Para leitura espectrofotométrica, o violeta cristal foi solubilizado em 200 μL de 0,5% SDS em 50% etanol. Homogeneizou-se fazendo movimentos delicados em 8 sobre a bancada por 10 minutos. As leituras de absorbâncias das placas foram feitas a 595 nm, utilizando leitor de placas.

Neste ensaio, as células que permaneceram vivas após o contato com o TiO_2 têm suas proteínas (presente em algumas organelas e no núcleo celular) coradas com o corante violeta cristal. Sendo assim, através da quantificação do violeta cristal pela espectroscopia de absorção UV-Visível é possível quantificar a porcentagem de células vivas.

Foi utilizado como controle negativo o meio de cultura DMEM, como controle positivo o peróxido de hidrogênio a 20 mM e o branco é o meio de cultura DMEM sem a presença de células. Fez-se outro branco somente com a solução teste para eliminar qualquer tipo de interferência da absorbância do TiO_2 .

Foram realizados três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas. A viabilidade celular dos tratamentos foi expressa em relação ao controle negativo.

A viabilidade celular tanto do ensaio utilizando MTT quanto de violeta cristal foi calculada como descrito na Equação 1, em que *Abs teste* é a absorbância de células com solução teste, *Abs brancos* é absorbância dos brancos contendo a solução teste, *Abs CN* é absorbância do controle negativo e *Abs branco* é absorbância do branco.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(\text{Abs teste} - \text{Abs brancos}) \times 100}{(\text{Abs CN} - \text{Abs branco})} \quad \text{Equação 1}$$

Para análise estatística da viabilidade celular das soluções teste comparadas com o controle negativo, os resultados foram avaliados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,1 %. As análises foram executadas através do software Graph Pad Prisma versão 5.01, 2007.

4.2.3. Potencial Zeta

O potencial zeta da dispersão das nanopartículas de TiO₂ foi realizado no ZetaSizer Nano ZS Zen3600 (Malvern Instruments) no Instituto de Química (UNESP-Araraquara) através de titulação ácido-básica. Foram escolhidas quatro formulações de xerogeis com duas razões de hidrólise diferentes (H1 e H2,3) e cada uma com diferentes razões de P (P2H2,3, P0,1H2,3, P0,05H1 e P0,5H1). As dispersões dos xerogeis foram feitas na concentração de 320 µg/mL e foram submetidas por cinco minutos no banho de ultrassom. Um solução de NaNO₃ 0,05mM foi usada como eletrólito inerte. O ajuste da titulação foi realizado com soluções de HNO₃ e NaOH a 0,25M dentro de uma faixa de pH entre 2-12. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.2.4. Obtenção de sistemas líquido-cristalinos

Para obter formulações que apresentassem estruturas líquido-cristalinas foram desenvolvidas 24 formulações variando-se a quantidade de água Milli-Q como fase aquosa, palmitato de isopropila como fase oleosa e o álcool cetílico etoxilado (20 óxidos de etileno (OE)) e propoxilado (5 óxidos de propileno (OP)) (Procetyl AWS) como tensoativo. As formulações foram obtidas a temperatura ambiente misturando-se sob agitação mecânica o tensoativo com a fase oleosa e por último a fase aquosa.

Também se utilizou outro tensoativo Ceteth-10 (Brij56) com as mesmas fases oleosas e aquosas utilizadas com o tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado (palmitato de isopropila como fase oleosa e água Milli-Q como fase aquosa). O Ceteth-10 foi aquecido até se liquefazer e depois foi misturado com a fase oleosa e por último com a fase aquosa utilizando agitador mecânico. A Figura 3 traz as fórmulas dos dois tensoativos citados.

Todas as formulações que não estavam entre pH 5 e 7 foram ajustadas com solução aquosa de NaOH (100 mg/mL) e/ou ácido cítrico (100 mg/mL).

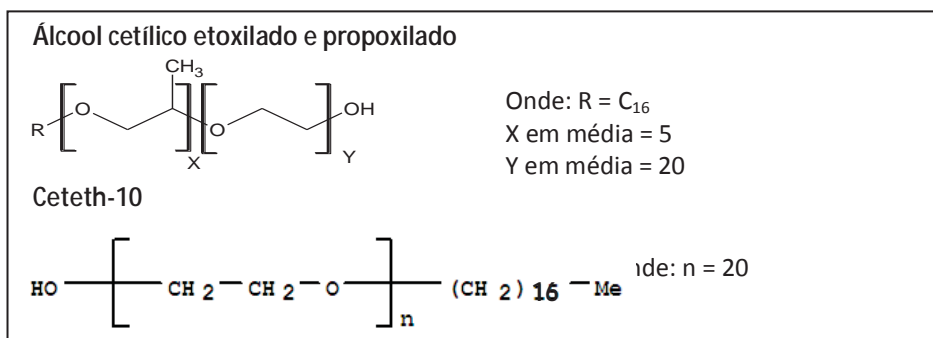


Figura 2 - Fórmula estrutural dos tensoativos álcool cetílico etoxilado e propoxilado e Ceteth-10.

4.2.5. Caracterização dos sistemas líquido-cristalinos

4.2.5.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)

As amostras foram analisadas pelo microscópio de luz polarizada, colocando-se uma pequena alíquota das formulações em uma lâmina, cobrindo-a com a lamínula. Foram utilizados lentes de aumento de 5, 10 e 20 vezes, dependendo da amostra.

4.2.5.2. Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) e um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 45 segundos. Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento, q , entre aproximadamente 0,1 e 2,3 \AA^{-1} .

Algumas amostras foram analisadas no laboratório de luz sincrotron SOLEIL-França, na linha SWING, sendo que a distância entre amostra e o detector variou de 0,508 a 0,550 m. O espalhamento do kapton e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 1 segundo. Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento, q , entre aproximadamente 0,14 e 3 \AA^{-1} .

4.2.6. Incorporação das nanopartículas de TiO_2 e do terpinem-4-ol

Incorporou-se as nanopartículas de TiO_2 em três formulações líquido-cristalinas listadas na Tabela 1 que serão referenciadas no texto daqui em diante como: Formulação base I, Formulação base II e Formulação base III. Os xerogeis avaliados foram P0,05H1, P0,05H2,3, P0,1H2,3, P0,2H2,3, P0,5H1 e P2H2,3. Prosseguiu-se de duas maneiras:

- Dispersou-se o sol/xerogel na fase oleosa juntamente com o tensoativo, acrescentou-se a água, utilizando-se o agitador mecânico em todas as etapas e por último corrigiu-se o pH;
- Incorporou-se nas formulações base I, II, e III o pó com ajuda de um bastão de vidro e por último corrigiu-se o pH.

Tabela 1 - Composição das três formulações de escolha de trabalho.

Formulação base	Tensoativo (%)	Palmitato de Isopropila (%)	H ₂ O (%)
I	Álcool cetílico etoxilado e propoxilado - 35	15	50
II	Álcool cetílico etoxilado e propoxilado - 48,3	30	21,7
III	Ceteth-10 – 30	10	60

Para a incorporação do terpinem-4-ol foram escolhidas seis formulações descritas na Tabela 2. O terpinem-4-ol foi incorporado na fase oleosa juntamente com o tensoativo e o TiO₂ e por último adicionou-se a água e corrigiu-se o pH entre 5 e 7. Em todas as formulações foi incorporado 1% do terpinem-4-ol retirando-se 1% da fase oleosa. Somente na formulação 4 que foi incorporado 1 e 5% do terpinem-4-ol para realização do teste de liberação do ativo.

Tabela 2 - Descrição das formulações escolhidas para incorporação de 1 % de terpinem-4-ol.

Formulação	Formulação base	% xerogel em relação a base
1	I	15 P0,05H1
2	II	30 P0,5H1
3	II	30 P2H2,3
4	II	30 P0,2H2,3
5	III	30 P0,5H1
6	III	30 P2H2,3

4.2.7. Caracterização físico-química das formulações com TiO₂ e terpinem-4-ol

As formulações foram caracterizadas por MLP e SAXS descritos pelos itens 4.2.5.1. e 4.2.5.2., respectivamente.

4.2.8. Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do terpinem-4-ol

Escolheu-se a formulação 4 (1% e 5%) para avaliar o perfil de liberação *in vitro* do terpinem-4-ol, comparando-se com o controle terpinem-4-ol solubilizado em propilenoglicol a 1 e 5%. O teste de liberação foi realizado em seis replicatas para cada

formulação no equipamento Microette (Hanson) constituído por células de Franz. Estas células de difusão são constituídas por dois compartimentos: (i) compartimento receptor, onde a fase receptora fica sob agitação (300rpm) e temperatura controladas (32,5°C) e (ii) compartimento doador, onde a formulação fica armazenada, separados por uma membrana sintética de acetato de celulose 0,45 µm.

O método de liberação do terpinem-4-ol utilizado foi baseado na metodologia de Nielsen (NIELSEN e NIELSEN, 2006), validado previamente (MACCARI, F. L. R., 2011). Foi utilizada a solução de cloreto de sódio a 0,9% contendo 1% de Tween 80 como solução receptora. O ensaio foi realizado utilizando-se um volume de solução receptora suficiente para que a concentração do soluto não ultrapassasse mais que 10-15% de sua solubilidade máxima e garantir assim que a velocidade de dissolução não seja diminuída por causa da aproximação com a concentração de saturação, chamada de “condição sink”. A formulação foi colocada no anel dosador com uma massa média de 336 mg em uma área de exposição de 1,77 cm². Amostras de 2 mL foram coletadas nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas para avaliar a liberação. Descartou-se um volume de 0,8 mL antes de cada coleta e o volume coletado foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras coletadas foram lidas pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a 200 nm. Os cálculos que determinam a quantidade real liberada (Q real) seguem a Equação 2:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{USP, 2009}) \quad \text{Equação 2}$$

onde:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t ;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume da solução receptora (7 mL)

C_c = concentração da amostragem anterior

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza)

Os parâmetros utilizados no método validado de quantificação do terpinem-4-ol são:

Volume de injeção: 30 µL

Fluxo: 1 mL/minuto

Fase móvel: Acetonitrila:água (55:45)

Coluna: C18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Agilent Zorbax Eclipse)

Temperatura da coluna: 25 °C

Comprimento de onda: 200 nm

Foi realizado o teste de especificidade para verificar se há interferência do pico do placebo no pico do padrão. Portanto, foi preparado em triplicata solução de padrão a 50 µg/mL em acetonitrila (ACN) e solução de placebo (diluí-se 125 mg do placebo em 5 mL de ACN e depois se diluiu 1:5 em na fase móvel).

Fez-se a curva analítica em solução receptora utilizando nove padrões de terpinem-4-ol em triplicata nas seguintes concentrações: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 350 µg/mL. Os valores obtidos da área sob a curva pela CLAE foram aplicados na equação da curva analítica.

4.2.9. Teste de FPS *in vitro*

Foram realizadas medidas de FPS *in vitro* das amostras líquido-cristalinas com e sem a incorporação dos xerogéis. As medidas foram realizadas em São Paulo – SP, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP, utilizando o espectrofotômetro Labsphere. O substrato utilizado foi a fita transpore 3M colada na placa de quartzo de 4 cm². As amostras foram aplicadas no substrato em uma dosagem de 2 mg/cm² e espalhadas homogeneamente com uma dedeira. Cada amostra foi feita em triplicata. As placas ficaram secando em local sem a presença de luz por aproximadamente 20 minutos. As medidas de absorvância entre 250 e 450 nm foram feitas em nove pontos diferentes da placa. Fez-se também a leitura do substrato sem aplicação de amostra como branco, sendo utilizada na base de dados como referência de 100% de transmitância. Utilizou-se o método Boots Star (Revisão 2008) do software do equipamento como ferramenta de análise dos dados coletados. Leituras de amostras que apresentaram coeficiente de variação maior que 20% foram descartadas.

4.2.10. Espectroscopia de Reflectância Difusa

As amostras líquido-cristalinas com e sem as nanopartículas de TiO₂ foram submetidas a medidas de reflectância difusa no espectrofotômetro Cary com acessório HARRICK. As formulações foram colocadas no porta-amostra e tiveram sua superfície melhor homogeneizadas com ajuda de uma lâmina de vidro. As leituras foram realizadas entre 200 e 800 nm e os resultados foram obtidos em porcentagem de reflectância (%R). O óxido de magnésio (MgO) foi utilizado como referência para 100% de reflectância.

5. Resultados e Discussão

Para apresentar e discutir os resultados com maior clareza optou-se por dividi-los em três capítulos:

I - Obtenção de xerogeis de TiO₂: neste capítulo será discutida a obtenção das nanopartículas de TiO₂, sua citotoxicidade e potencial zeta;

II – Obtenção e caracterização de formulações líquido-cristalinas contendo TiO₂ e terpinem-4-ol: neste capítulo serão apresentadas as formulações líquido-cristalinas, suas caracterizações através da microscopia de luz polarizada e SAXS e o teste de liberação *in vitro* do fármaco;

III – Avaliação da capacidade de proteção solar das formulações: neste capítulo discutirá os resultados obtidos de FPS *in vitro* e de reflectância difusa.

CAPÍTULO I - Obtenção de xerogeis de TiO_2

I.1. Obtenção de xerogeis

Para a realização deste trabalho foram desenvolvidas várias composições de xerogeis variando a razão molar do modificador de superfície PTSH em relação ao Ti (P) e a razão de hidrólise (H), conforme descrito no item 4.2.1. A Figura I.1 traz a foto de um xerogel e do TiO_2 de uso comercial. Nota-se que o xerogel obtido tem aspecto de um pó mais fino do que o TiO_2 de uso comercial.



Figura I.1 - Foto do xerogel obtido através do processo sol-gel e do TiO_2 de uso comercial.

I.2. Teste de Citotoxicidade

O ensaio usualmente realizado para avaliar a citotoxicidade de TiO_2 é o ensaio colorimétrico MTT (FUJITA, 2009; JIN, 2008; SAYES, 2006). Como este ensaio se baseia na redução do sal MTT, avaliou-se se a solução teste poderia estar reduzindo-o devido à presença de um modificador de superfície nas nanopartículas avaliadas. Foi colocado em cada poço 100 μ L da solução teste, 10 μ L de MTT. Fez-se um branco com 100 μ L da solução teste, 10 μ L de PBS e foi testado também um TiO_2 comercial em contato com 10 μ L de MTT. Incubou-se a placa por quatro horas a 5% CO_2 e temperatura de 37°C. Foi observada a redução do sal MTT somente com a solução teste. Isso se deve, possivelmente, à interação dos elétrons do anel aromático do ácido PTSH com o MTT. Por isso, foi utilizado outro ensaio, o violeta cristal. A figura I.2 apresenta as estruturas moleculares do MTT, do Violeta Cristal e do ácido PTSH.

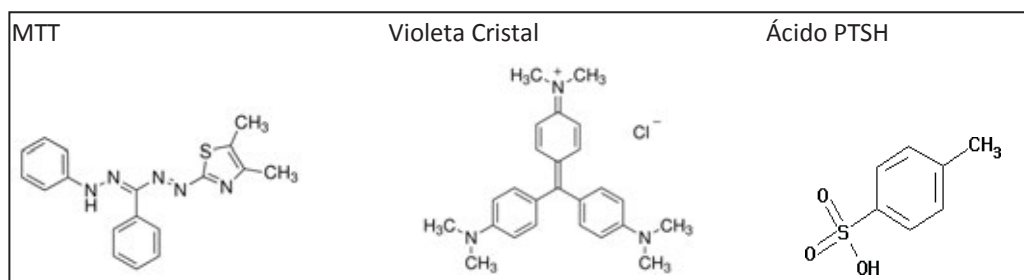


Figura I.2 - Estruturas moleculares do MTT, do Violeta Cristal e do ácido p-tolueno sulfônico (PTSH).

As Figuras I.3 e I.4 apresentam os gráficos de viabilidade celular do ensaio violeta cristal das duas linhagens de células utilizadas HaCaT e MRC-5, respectivamente. Nota-se que nas duas linhagens celulares, a viabilidade celular é maior que 70% para todas formulações de xerogeis. Testou-se separadamente o PTSH e observou-se que ele sozinho provoca uma citotoxicidade maior, mas não chega nem a 50% de morte celular. Entre os xerogeis testados na HaCaT, observou-se que o que tem a menor razão molar PTSH/Ti é o de maior viabilidade celular, ou seja, o que apresenta menor quantidade de ácido é menos citotóxico. Isso, porém, não aconteceu com a MRC-5: em cada concentração observou-se uma viabilidade celular maior com diferentes formulações de xerogeis.

No geral, os resultados e análises estatísticas mostraram que todas as formulações de TiO₂ avaliadas não apresentaram citotoxicidade significativa independente da concentração de TiO₂: as culturas celulares não sofreram modificações significativas comparadas ao controle negativo (ANOVA $p < 0.001$ seguida do teste de Tukey).

Já foi relatada na literatura a dificuldade de dispersar as nanopartículas no meio de cultura celular de maneira homogênea e manter esta dispersão durante o período de incubação sem que as nanopartículas se agreguem (FUJITA et al., 2009). Nota-se que em alguns resultados há um erro padrão considerável do teste e isso se deve, provavelmente, a não homogeneidade da dispersão das nanopartículas.

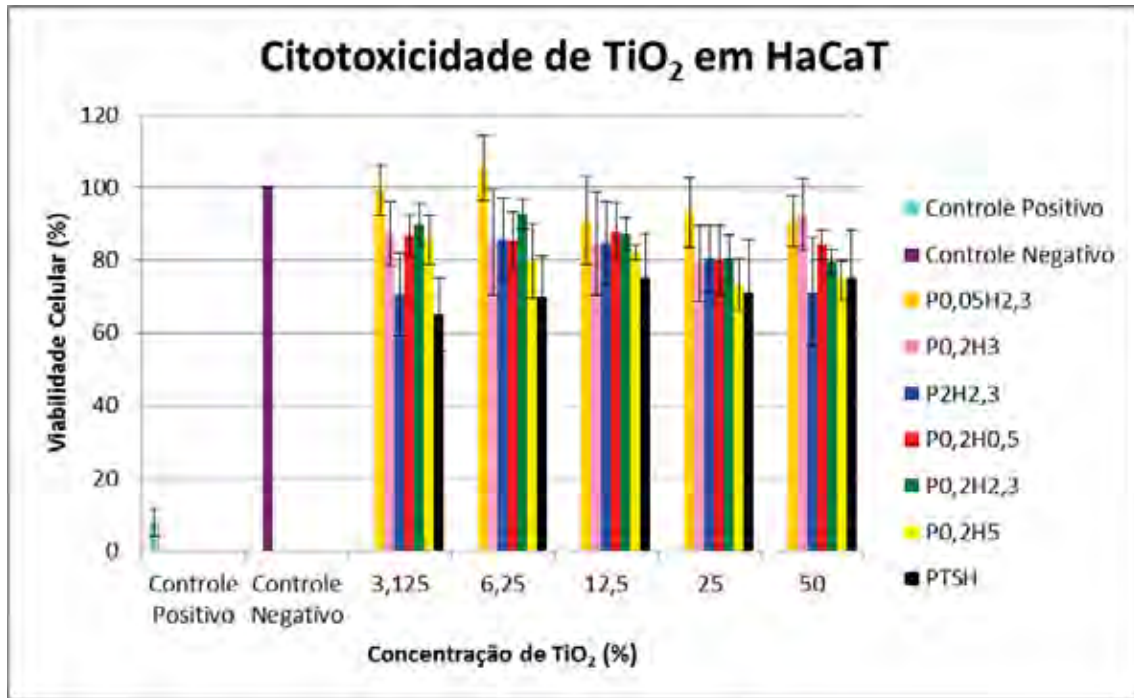


Figura I.3- Ensaio de citotoxicidade (violeta cristal) em células HaCaT. Porcentagem de células vivas após contato com diferentes formulações de xerogeis de TiO₂ nas concentrações 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 % (p/v). Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média ± erro padrão).

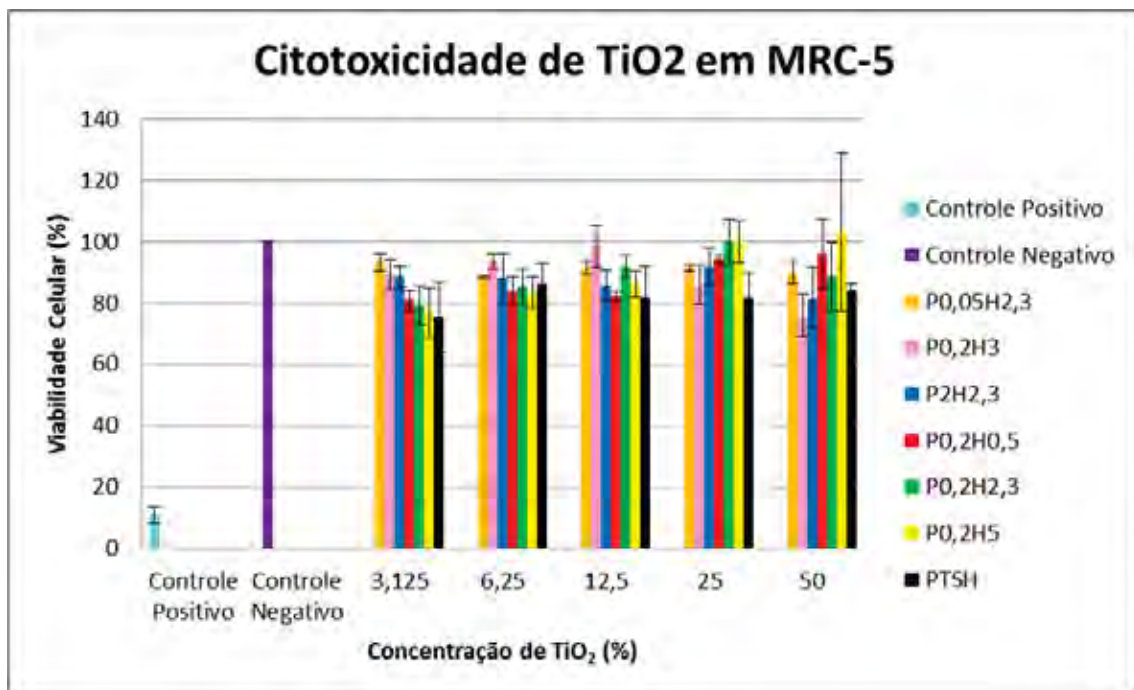


Figura I.4 - Ensaio de citotoxicidade (violeta cristal) em células MRC-5. Porcentagem de células vivas após contato com diferentes formulações de xerogeis de TiO₂ nas concentrações 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 % (p/v). Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média ± erro padrão).

I.3. Potencial Zeta

A Figura I.5 mostra o comportamento do potencial zeta diante da variação de pH das quatro formulações de xerogeis escolhidas e seus respectivos pontos isoelétricos (PI). Avaliando as formulações de mesma razão H_2O/Ti (H), as formulações contendo maior razão de $PTSH/Ti$ (P) são as que apresentam maior variação do potencial zeta. Isso se justifica pela presença elevada de densidade de carga eletrônica na superfície das nanopartículas provenientes do ácido PTSH. Nota-se também que os pontos isoelétricos das formulações estão ligados as razões de P: quanto maior P, maior o PI, mostrando que o PTSH altera a superfície das nanopartículas de TiO_2 .

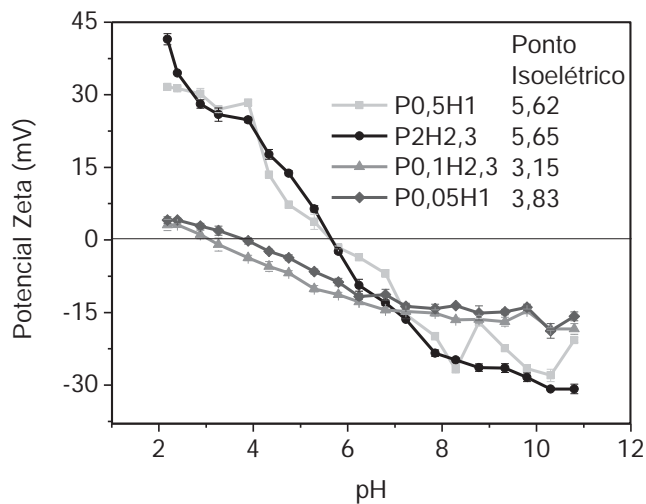


Figura I.5 - Potencial zeta de nanopartículas de TiO_2 em função do pH e pontos isoelétricos (PI).

A soma das forças de atração e repulsão entre as partículas individuais da dispersão é o que determina sua estabilidade e a formação de agregados (OTT e FINKE 2007). Os valores de potencial zeta altamente positivos e altamente negativos em pHs extremos se devem às interações eletrostáticas de repulsão (STUMM e MORGAN, 1996). Geralmente em valores de pH afastados do PI as forças repulsivas são superiores em relação às forças atrativas, tornando o potencial zeta mais positivo ou negativo (JIANG et al., 2009). Próximo do PI a aglomeração das nanopartículas tende a aumentar juntamente com reflexão da radiação UV visível evidenciando a cor branca do TiO_2 , o que é evitado em produtos cosméticos que prezam pelo apelo visual e sensorial dos produtos.

A presença de forças repulsivas dominantes é importante para obter sistemas monodispersos. A Figura I.5 mostra que em pHs entre 5 e 7, faixa usual para produtos de aplicação tópica, há a presença de valores de potencial zeta negativos significativos e para as formulações P0,5H1 e P2H2,3 há também valores de potencial zeta positivos significativos próximo do pH 5. Esses valores significativos de potencial zeta mostram a predominância de forças repulsivas. Portanto, é possível aplicar essas nanopartículas de TiO₂ em sistemas de uso tópico, evitando a irritação dérmica com pH variando entre 5 - 7 e ainda assim prevenir a aglomeração das nanopartículas que está diretamente relacionado a transparência dos sistemas.

As nanopartículas de TiO₂ obtidas através do processo sol-gel com a presença do ácido PTSH como modificador de superfície apresentam características que favorecem sua aplicação em formulações cosméticas. Os testes de citotoxicidade *in vitro* mostraram que os xerogéis não afetam significativamente a viabilidade celular de linhagem celular presente na pele (queratinócitos), favorecendo o seu uso tópico e de linhagem celular presente no pulmão (fibroblastos), o que torna a manipulação do xerogel sem maiores riscos quando inalado. Além disso, as nanopartículas apresentam cargas superficiais em pHs apropriados para produtos de aplicação tópica que impedem a agregação das nanopartículas propiciando sistemas mais estáveis e transparentes.

CAPÍTULO II – Obtenção e caracterização de formulações líquido-cristalinas contendo TiO₂ e terpinem-4-ol

II.1. Formulações líquido-cristalinas

Foram elaboradas 24 formulações com o tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado. As formulações preparadas apresentaram diferentes viscosidades, desde líquidas até semi-sólidas e algumas apresentaram separação de fase. Todas que não apresentaram separação de fase foram caracterizadas e duas formulações que apresentavam estrutura líquido-cristalinas foram escolhidas para a continuidade deste trabalho.

Foram preparadas somente 8 formulações com o tensoativo ceteth-10 e após as caracterizações físico-químicas uma que apresentou estrutura líquido-cristalina com arranjo hexagonal foi escolhida.

II.2. Caracterização físico-química dos sistemas líquido-cristalinos

O comportamento líquido-cristalino pode ser estudado pela microscopia de luz polarizada. Este método é o mais adequado para a identificação primária de mesomorfismo e as texturas observadas podem ser comparadas a texturas pré-definidas (GAISIN et al., 2010). A fase cúbica é identificada como um campo escuro, a fase hexagonal como estrias e a fase lamelar como cruces de malta (VICENTINI et al., 2008).

As formulações líquido-cristalinas obtidas foram preparadas a fim de servir como veículo para incorporação do TiO₂ e do terpinem-4-ol para que tenha a liberação deste de forma controlada.

A Figura II.1 apresenta fotomicrografias de microscopia de luz polarizada de algumas formulações desenvolvidas. Todas as formulações apresentam estrias o que caracteriza o arranjo hexagonal.

Embora a microscopia de luz polarizada, uma técnica mais rápida e de acesso mais fácil possa ser usada na identificação das fases líquido-cristalinas, a técnica mais adequada é o Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS). Esta técnica detecta o espalhamento dos raios-X em ângulos de θ menor que 10°, que corresponde a distâncias interplanares com dimensões nanométricas, sendo eficaz na caracterização de estruturas líquido-cristalinas. Como os sistemas líquido-cristalinos liotrópicos se revelam como

sistemas que controlam a liberação de ativos e fármacos, o SAXS tem-se mostrado essencial para entender o comportamento das estruturas nanoscópicas que os formam (DONG e BOYD, 2011).

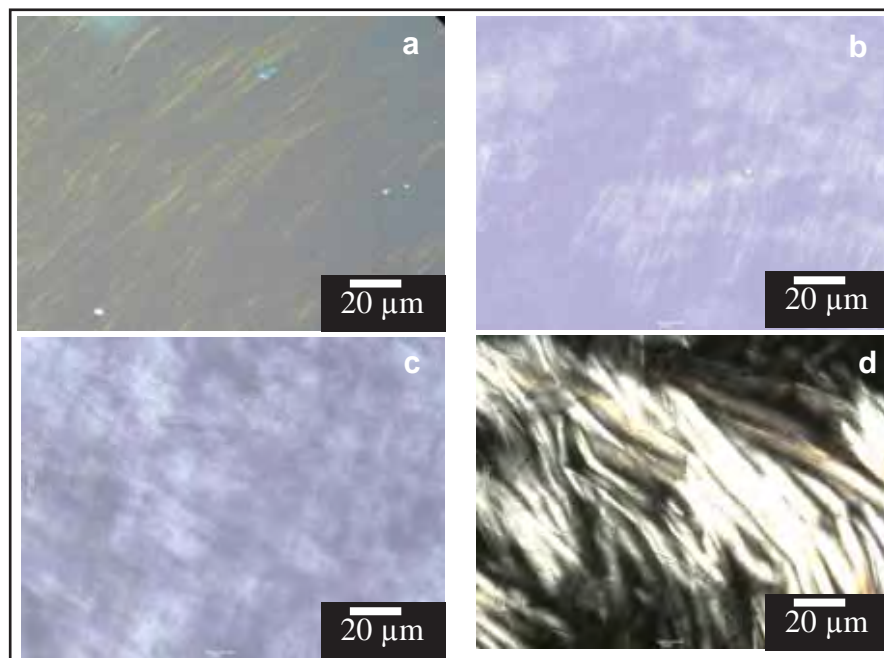


Figura II.1 - Fotografias de microscopia de luz polarizada de quatro formulações líquido-cristalinas, sendo (a) 30% palmitato de isopropila, 35% álcool cetílico etoxilado e propoxilado, 35% água, (b) formulação base I, (c) formulação base II e (d) formulação base

O SAXS pode fornecer informações referentes ao tamanho, formato e estrutura interna de macromoléculas e das estruturas de longa extensão, como o arranjo dos tensoativos, encontradas nos sistemas líquido-cristalinos (DONG e BOYD, 2011) e a posição relativa dos picos de SAXS no vetor de espalhamento (q) é o que determina a estrutura da fase cristalina (WANG e ZHOU, 2009). Para calcular a correlação da distância entre os objetos espalhadores usa-se a Equação 3:

$$d = 2\pi/q_{max}, \quad \text{Equação 3}$$

onde q_{max} é o valor de q no pico de refração. A relação da distância d calculada para cada pico deve seguir a relação $\sqrt{1} : \sqrt{3} : \sqrt{4}$ (NEGRINI e MEZZENGA, 2011) para fase hexagonal e 1:2:3:4:5 para fase lamelar (BINNEMANS, 2005). Além disso, sabe-se que quanto mais definido o pico, maior é o fator de estrutura que dá informações sobre as interações e a correlação espacial entre os objetos espalhadores.

Na Figura II.2 seguem os gráficos de SAXS da formulação base I (35% álcool cetílico etoxilado e propoxilado, 15% palmitato de isopropila e 50% água), II (48,3% álcool cetílico etoxilado e propoxilado, 30% palmitato de isopropila e 21,7% água) e III

(30% de ceteth-10, 10% de palmitato de isopropila e 60% de água). As formulações apresentam picos que caracterizam a fase hexagonal, entretanto a formulação com maior concentração de álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Figura II.2.B) apresenta picos mais estreitos e, portanto, é mais estruturada. Isso se deve, supostamente, por uma estruturação maior dos tensoativos que formam os cilindros da fase hexagonal.

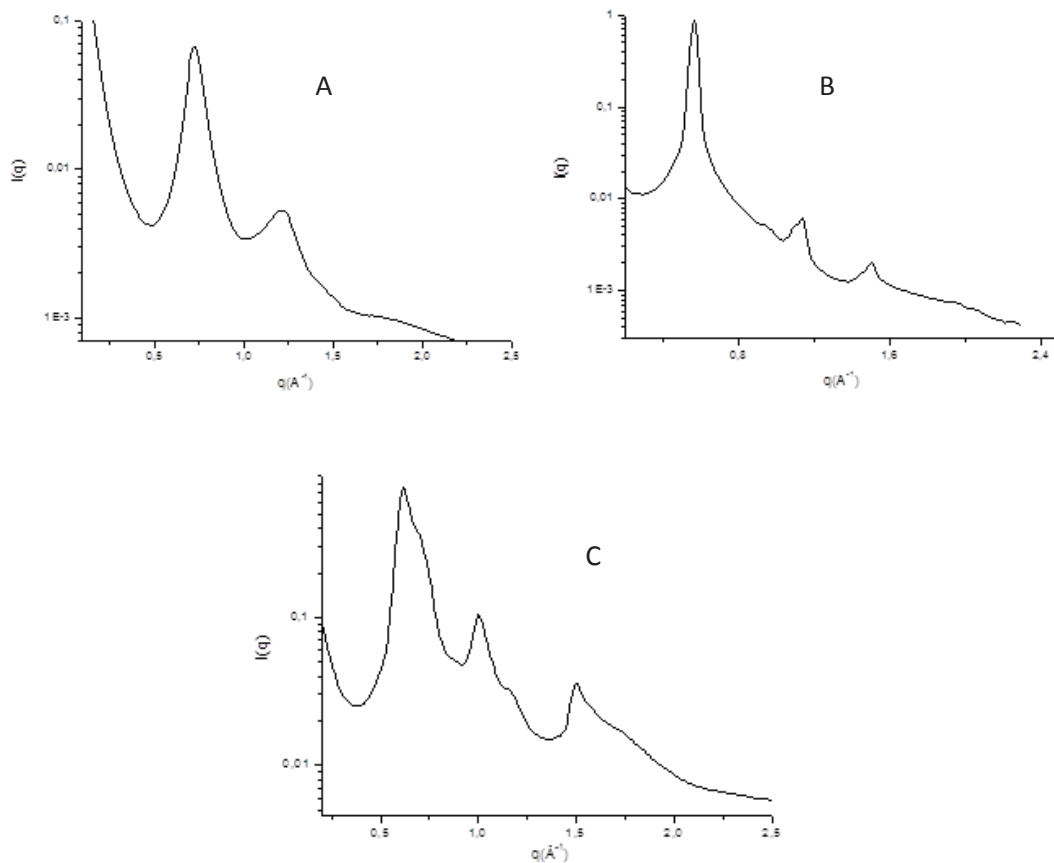


Figura II.2 - Gráfico de SAXS das formulações base I (A), II (B) e III (C).

Pode-se com a microscopia de luz polarizada e com SAXS identificar a presença de estruturas líquido-cristalinas de fase hexagonal nas formulações base preparadas.

II.3. Incorporação de xerogel de TiO_2 em formulações líquido-cristalinas

As formulações líquido-cristalinas obtidas com o tensoativo álcool cetílico etoxilado e propoxilado variando de 30 a 60% e com diferentes proporções de fase aquosa (variando de 10 a 50%) e oleosa (variando de 10 a 60%) incorporaram tanto o sol quanto o xerogel em uma concentração final de TiO_2 de até 15% e 21,43% nas

formulações quando utilizaram-se o sol e xerogel, respectivamente. Tentou-se selecionar formulações com melhor aspecto sensorial, geralmente com menor porcentagem de fase oleosa e que não apresentaram separação de fase.

Utilizando o sol, porém, depois de uns dias as formulações separaram de fase e as que permaneceram estáveis não apresentaram um sensorial agradável ao espalhar na pele, sem aderência na pele e algumas ficaram esbranquiçadas. Isso se deve provavelmente a evaporação do isopropanol da suspensão coloidal (sol), causando alteração das proporções das fases que formam o sistema líquido-cristalino, aumentando sua desestruturação. Devido a esses fatores, optou-se por trabalhar somente com os xerogeis. Na formulação com o tensoativo ceteth-10, portanto, só foram incorporados xerogeis.

Quanto ao modo de incorporar os xerogeis, quando colocados antes da adição da água ficam mais homogêneos e de fácil manipulação do que quando incorporados a formulação líquido-cristalina já pronta.

A Figura II.3 mostra fotos de formulações aplicadas sob uma superfície azul a fim de comparar a transparência das nanopartículas de TiO_2 obtidas através do processo sol-gel e com TiO_2 de uso comercial. Na parte superior da figura estão as formulações base III e na parte inferior da figura estão as formulações base II. Nota-se que para todas as formulações a ordem de transparência em relação ao xerogel é $\text{P2H2,3} > \text{P0,5H1} > \text{P0,2H2,3}$, ou seja, quanto maior a quantidade de ácido na composição do xerogel, maior a transparência. Isso se justifica pela maior presença de carga eletrônica na superfície das nanopartículas contendo mais ácido e, portanto, impede a agregação das partículas evitando a reflexão da radiação UV-Visível.

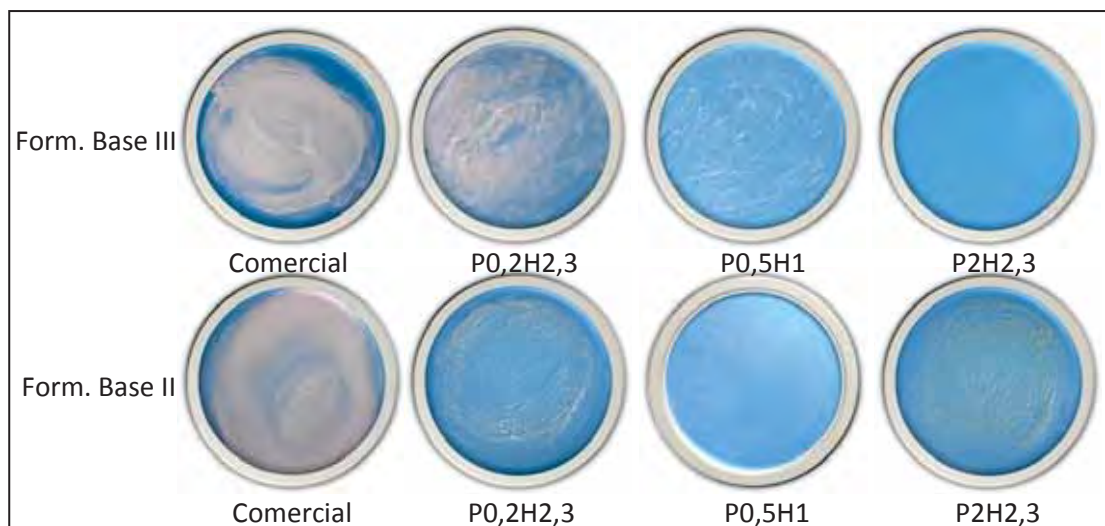


Figura II.3 - Fotos de formulações contendo 30% de xerogel de TiO_2 P0,2H2,3, P0,5H1 e P2H2,3 e de 15% de TiO_2 de uso comercial. Na parte superior da figura são compostas por formulações base III e na parte inferior são compostas por formulações base II.

Ao passar na pele algumas formulações são difíceis de espalhar, outras apresentam sensação de grãos finos desaparecendo conforme é espalhada, outras deixam a pele brilhante, mas nenhuma deixa a pele branca, comparado ao TiO_2 de uso comercial, atingindo um dos objetivos deste trabalho.

II.3.1. Caracterização dos sistemas líquido-cristalinos contendo xerogel de TiO_2

A Figura II.4 apresenta fotomicrografias das formulações líquido-cristalinas contendo xerogeis de TiO_2 . As imagens revelam que a presença dos xerogeis não altera o arranjo hexagonal do sistema líquido-cristalino, pois é possível observar a presença de estrias características da fase hexagonal.

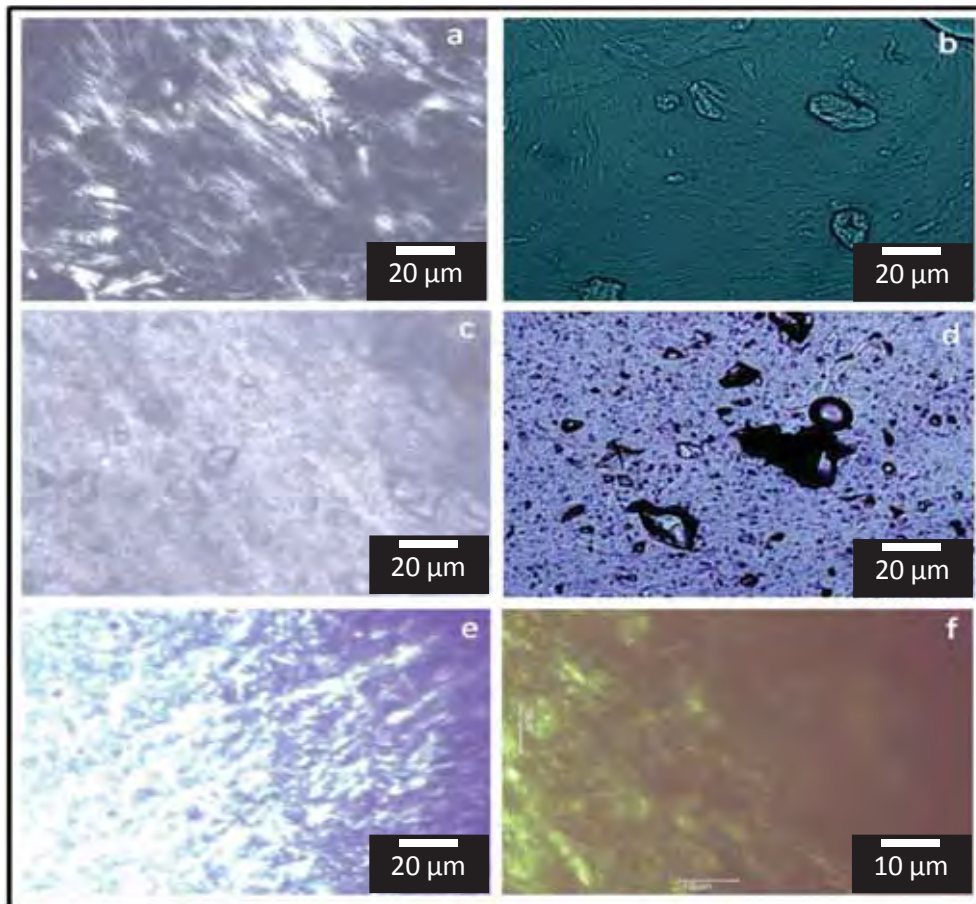


Figura II.4 - Fotomicrografias de microscopia de luz polarizada de formulações base III com (a) 5% de xerogel P0,05H1 (e) 30% de xerogel P0,2H2,3 (f) 30% de xerogel P2H2,3; formulações base II com (b) 10% de xerogel P0,5H1 (c) 10% xerogel P0,05H2,3; formulações base I com (d) 10% de xerogel P0,1H2,3.

A Figura II.5 contém as figuras com as curvas de SAXS referentes a amostras contendo xerogel (concentrações variando de 15%, 30% e 40% de xerogel). As medidas de SAXS mostram que:

- (i) algumas formulações líquido-cristalinas obtidas mantêm a estrutura líquido-cristalina (apresenta os picos que sinalizam a fase líquido-cristalina (C e E));
- (ii) outras perdem sua organização (presença de um único pico alargado (A, B, D, F e G));
- (iii) enquanto que a formulação ilustrada no gráfico H mostra claramente a presença de fase hexagonal mais estruturada (estreitamento dos picos).

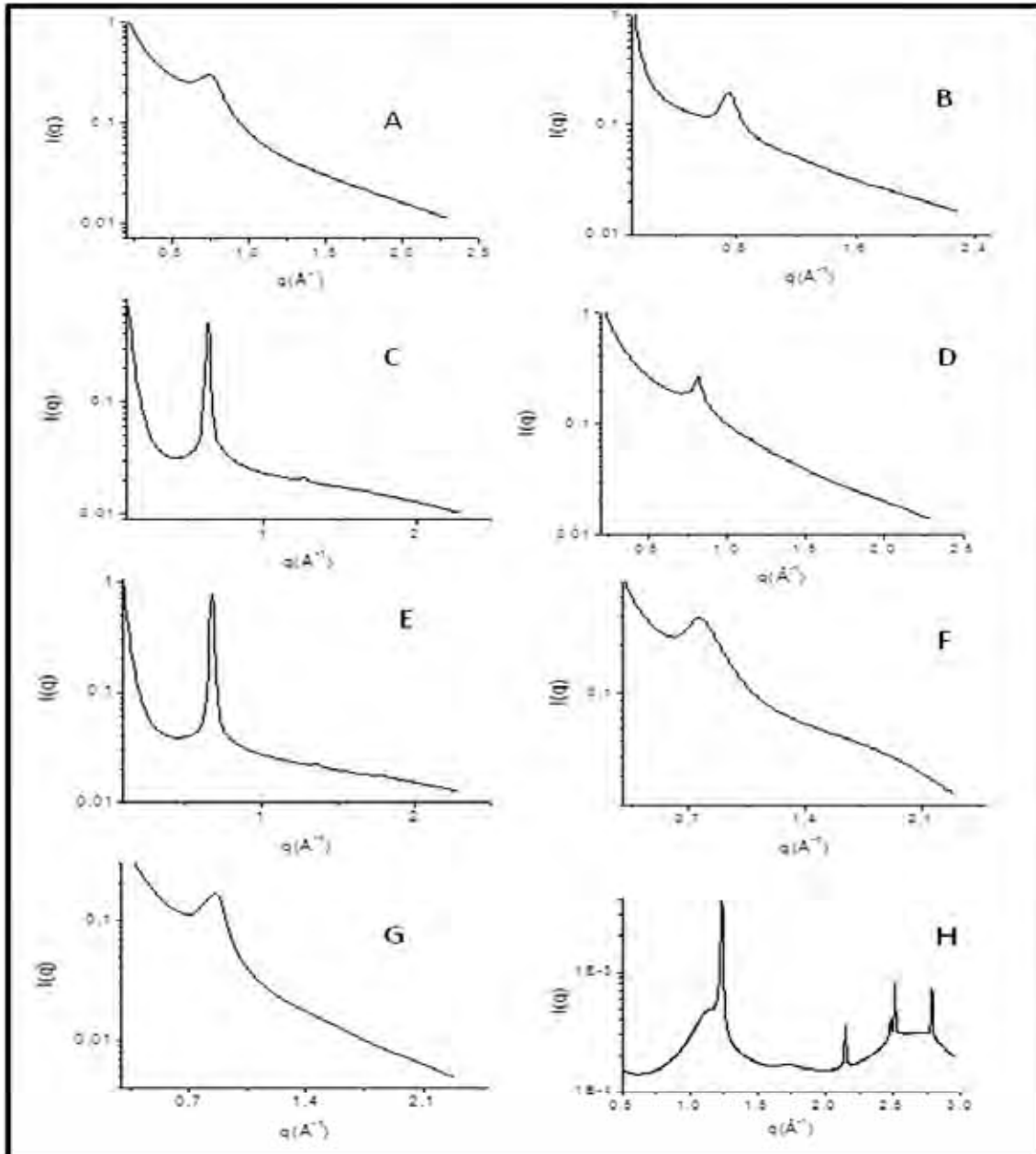


Figura II.5 - Gráfico de SAXS das formulações base II com a incorporação de 30 % de xerogel P0,5H1 (A), P0,05H1(C), P0,2H2,3(E) e P2H2,3(G) e 40% de P0,5H1 (F). A formulação (H) é a formulação base I com a incorporação de 15 % de xerogel P0,5H1. As formulações B, D são formulações base III contendo 30% de xerogel P0,2H2,3(B) e P0,5H1(D), respectivamente.

A formulação que apresentou curva de SAXS com picos mais estreitos tem 15% de xerogel P0,5H1, que pode estar interagindo com a parede do cilindro que forma a fase hexagonal favorecendo sua organização. Entretanto, a presença dos xerogeis a 30 e 40% promove um alargamento dos picos dos gráficos, o que indica a desestruturação do arranjo intermolecular do sistema líquido-cristalino (A, B, D, F e G), exceto com as

formulações C e E que apresentam picos mais estreitos. Dependendo dos componentes que compõem a formulação (xerogel e formulação base) é possível obter sistemas líquido-cristalinos contendo nanopartículas de TiO₂ de superfície modificada.

II.4. Incorporação de terpinem-4-ol

Sabendo-se que as formulações líquido-cristalinas com a presença de xerogel permanecem com arranjos moleculares organizados, incorporou-se o terpinem-4-ol, em alguma delas (Formulação base I + 15 % P0,05H1; Formulação base II + 30 % P0,5H1, P2H2,3 e P0,2H2,3; Formulação base III + 30% P0,5H1) para avaliar se houve a manutenção do arranjo cristalino. Esta caracterização possibilita compreender o perfil de liberação do terpinem-4-ol. Todas as amostras foram analisadas pela microscopia de luz polarizada, porém só foi possível obter micrografias adequadas de quatro: Formulação base I +15% P0,05H1 + 1% terpinem-4-ol; Formulação base II + 30 % P0,5H1 + 1% terpinem-4-ol; Formulação base II + 30 % P0,2H2,3 + 1 e 5% terpinem-4-ol (Formulações 1, 2 e 4 da Tabela 2). A Figura II.6 apresenta as micrografias que caracterizam a fase hexagonal do sistema líquido-cristalino com a presença de estrias. Cabe ressaltar que a identificação de estrias nas fotos não é tão evidente quanto o observado no microscópio.

A Figura II.7 apresenta as curvas de SAXS da formulação 4 contendo 1 e 5% de terpinem-4-ol. Pode-se identificar a fase hexagonal em ambas concentrações de terpinem-4-ol pelas posições relativas dos picos, comprovando a fase observada com estrias pela microscopia de luz polarizada.

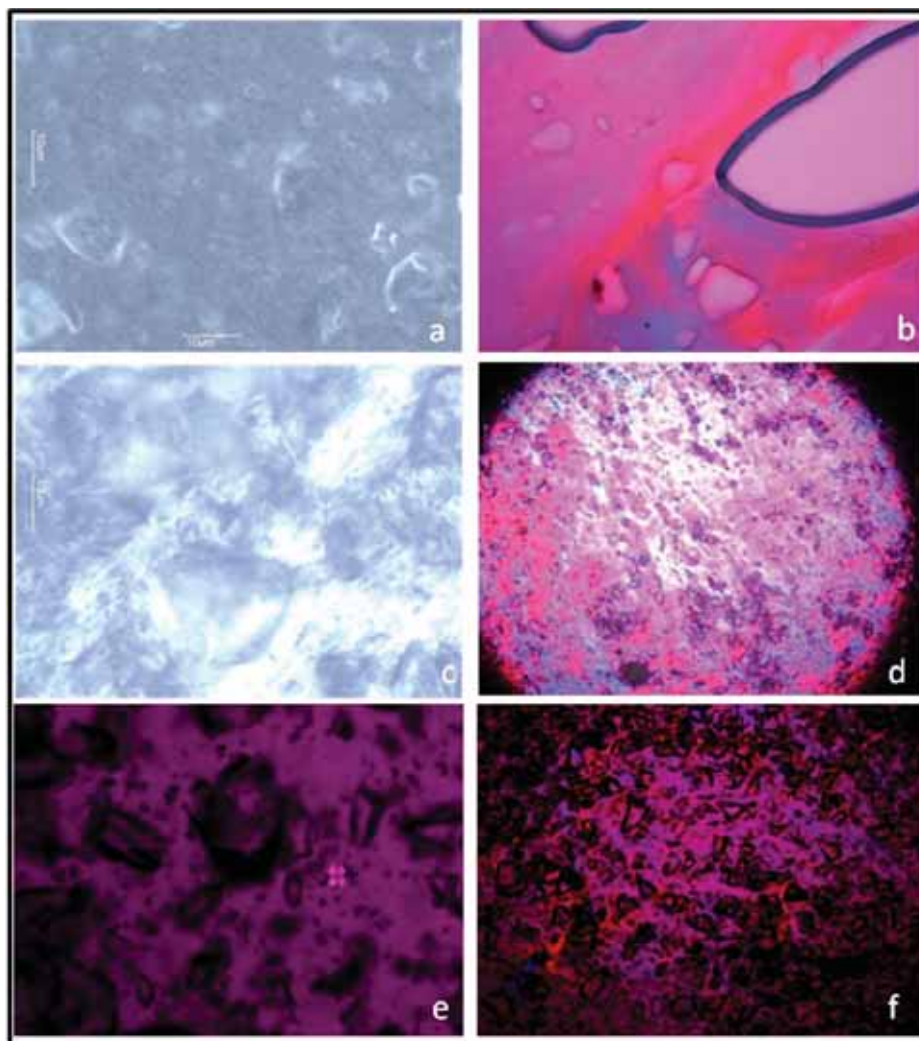


Figura II.6 - Fotomicrografias de microscopia de luz polarizada das formulações (a) 1, (b) 2, (c e d) 4 (1%) e (e e f) 4 (5%) listadas na Tabela 2.

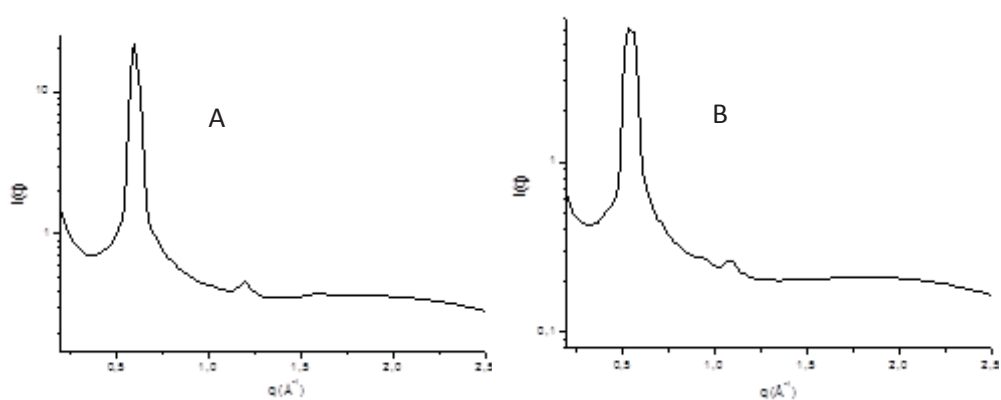


Figura II.7 – Curva de SAXS da formulação 4 listada na Tabela 2 contendo 1% (A) e 5% (B).

II.5. Teste de liberação *in vitro*

II.5.1. Teste de especificidade

O teste de especificidade foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.8 para eliminar possíveis interferentes do placebo na quantificação do ativo. A Figura II.8 apresenta as leituras pela CLAE do placebo e do padrão. Pode-se observar que não há interferência dos picos do placebo e da fase móvel com o pico do padrão.

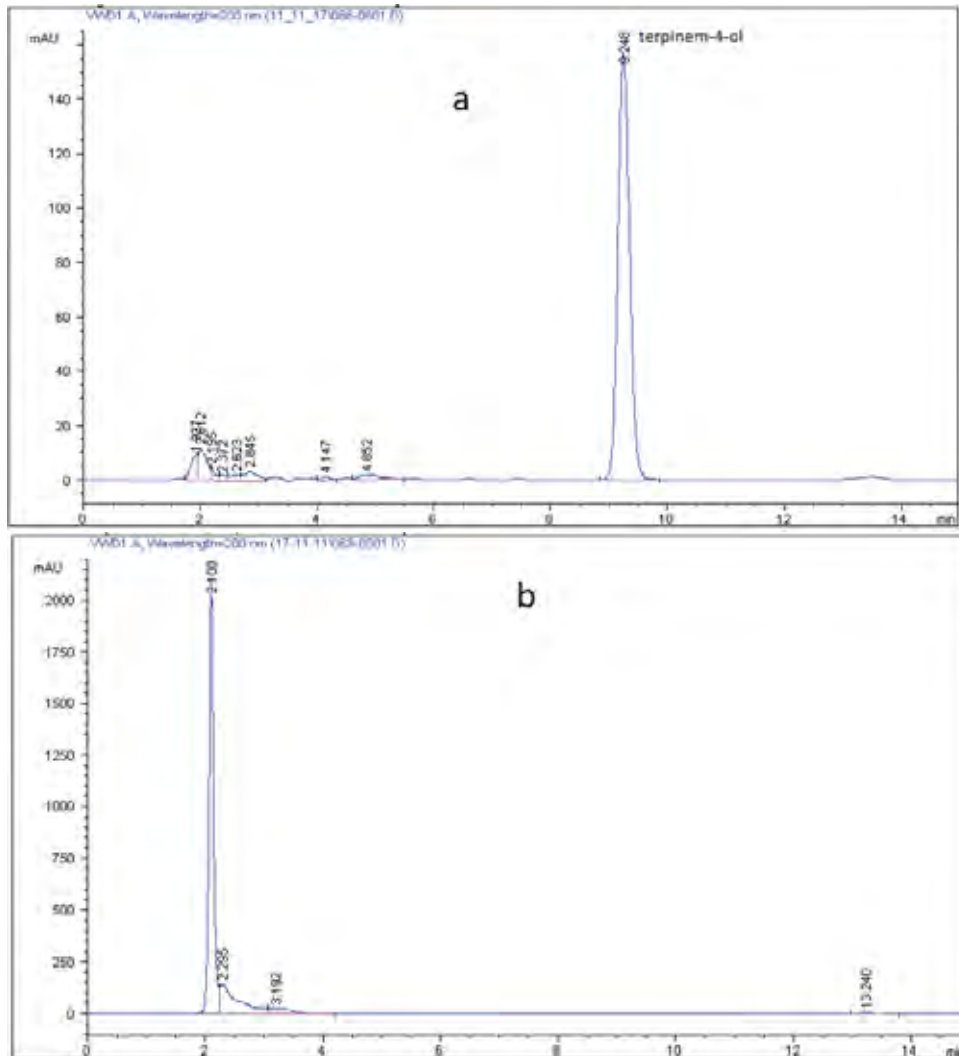


Figura II.3 - Injeção do padrão (a) e do placebo da formulação (b).

II.5.2. Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída segundo metodologia descrita no item 4.2.8.

A Figura II.9 apresenta o gráfico da curva analítica com a equação da reta e coeficiente de correlação (r^2). A curva apresentou-se linear e com valor de r^2 dentro do requerido pela ANVISA (mínimo 0,99) (BRASIL, 2003).

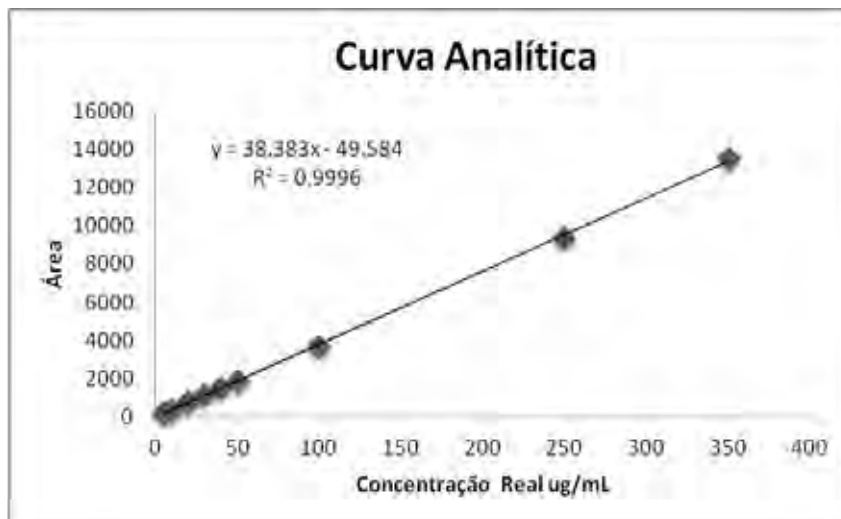


Figura II.4 - Curva analítica do terpinem-4-ol, equação da reta (y) e o respectivo coeficiente de correlação (R^2).

II.5.3 Teste de liberação *in vitro* do terpinem-4-ol

Foi realizado o teste de liberação *in vitro* com a formulação 4 da Tabela 2 (48,3% de álcool cetílico etoxilado e propoxilado, 29% palmitato de isopropila, 21,7% de água, 30% P0,2H2,3) que apresentou estrutura ordenada com arranjo hexagonal, contendo 1 e 5% de terpinem-4-ol. As concentrações de terpinem-4-ol foram calculadas através dos valores da área sob a curva do pico referente à saída do fármaco medidas por CLAE. Este valor foi aplicado na equação da reta apresentada na Figura II.9 para a obtenção da concentração de fármaco liberada. As Tabelas II.1 e II.2 apresentam os resultados encontrados para a formulação 4 contendo 1 e 5%, respectivamente. O coeficiente de variação (CV) é calculado através da Equação 4:

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde DP é o desvio padrão e M é a média das seis replicatas.

Observa-se que o CV do teste de liberação está dentro dos limites das especificações, ou seja, menores que 10%. É importante ressaltar que a % liberada em cada tempo foi parecida para as formulações 4 com diferentes concentrações de

fármaco, demonstrando a capacidade da matriz em controlar a liberação do terpinem-4-ol, independentemente da sua concentração.

Tabela II.1 - Liberação de terpinem-4-ol da formulação 4 (1%)

Tempo (h)	Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
0,5	17.56	0,9251	9.0258
1	31.76	1,6731	7.0643
2	57.70	3,0395	7.2322
4	100.17	5,2769	8.0789
6	147.27	7,7579	9.7358
8	183.30	9,6559	4.5489
10	223.44	11,7704	7.3960
12	255.95	13,483	5.7037

Tabela II.2 - Liberação de terpinem-4-ol da formulação 4 (5%)

Tempo (h)	Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
0,5	67,13	0,7073	5,0930
1	123,67	1,3029	5,3074
2	226,58	2,3872	3,1339
4	426,69	4,4955	1,7402
6	639,86	6,7413	2,0650
8	834,54	8,7925	2,2025
10	1004,76	10,5858	1,5328
12	1175,98	12,3898	1,5399

No teste de liberação *in vitro* há duas constantes que devem ser consideradas, uma constante de liberação K_1 que representa a passagem do ativo da formulação para o meio externo e a constante de permeação K_2 que representa a passagem do ativo pela membrana de celulose. A Figura II.11 traz um esquema representativo da célula de Franz e ilustra onde estão agindo as duas constantes acima citadas no ensaio de liberação.

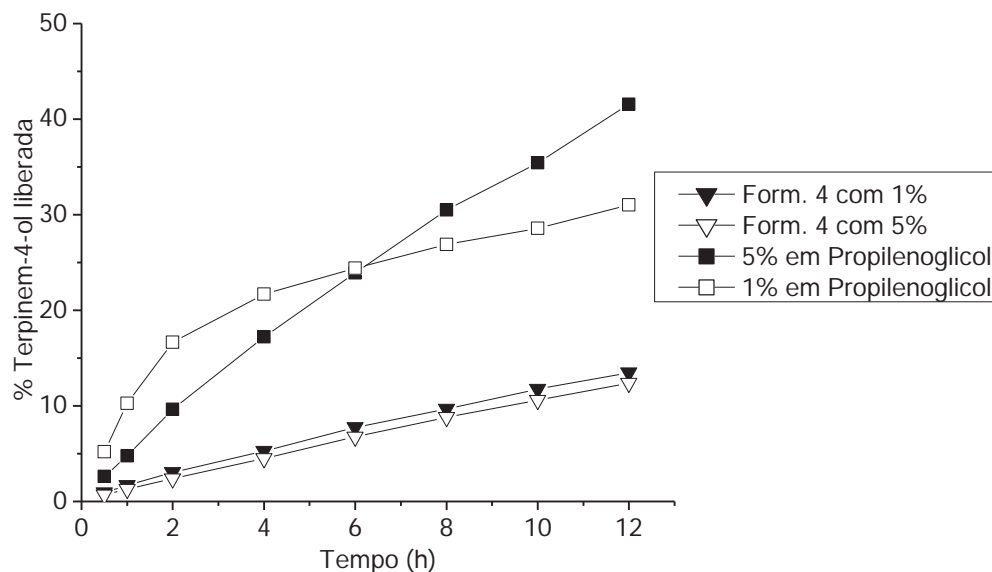


Figura II.5 - Perfil de liberação das formulações 4 com 1 e 5% de ativo e de terpinem-4-ol solubilizado em propilenoglicol a 1 e 5%.

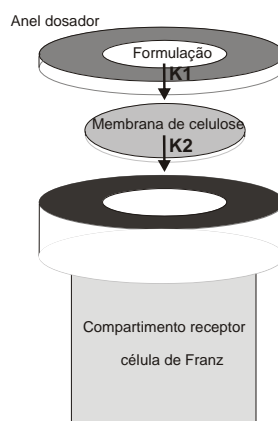


Figura II.6 - Esquema de liberação do ativo e a constante de liberação K_1 e constante de permeação K_2 envolvidas no processo global de liberação.

No teste do fármaco solubilizado em propilenoglicol a constante de liberação K_1 deve ser muito alta, pois o propilenoglicol age somente como solvente e é rapidamente liberado, portanto, o gradiente de concentração do fármaco é maior antes da membrana do que no compartimento receptor da célula de Franz, proporcionando assim a permeação mais rápida do mesmo. Dessa forma, espera-se que a porcentagem liberada do terpinem-4-ol seja superior àquela do fármaco incorporado em sistemas de liberação controlada. No caso da formulação 4 observamos que a liberação do terpinem-4-ol chega a ser de 2 a 3 vezes menor do que a observada para este fármaco dissolvido em propilenoglicol. Isso ocorre provavelmente em função da estrutura ordenada existente

na formulação 4, que diminui a mobilidade das moléculas do fármaco devido a presença de barreiras físicas existentes em razão da formação dos cilindros de tensoativo da fase líquido-cristalina. Nestas formulações o fármaco pode estar presente tanto na interface tensoativo-óleo ou ainda interagindo com a fase oleosa localizada no interior dos cilindros, sendo liberado lentamente. Consequentemente, em função do baixo gradiente de concentração, sua passagem para o compartimento receptor será mais lenta, com perfil de liberação característico de um sistema de liberação sustentado.

Para compreender a cinética de liberação do fármaco três modelos matemáticos, foram aplicados aos resultados obtidos: zero ordem, (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função do tempo), primeira ordem (logaritmo da porcentagem de fármaco em função do tempo) e Higuchi (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função da raiz quadrada do tempo). A tabela II.3 traz o coeficiente de correlação (R^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático às curvas experimentais para a formulação avaliada com diferentes concentrações de fármaco.

Tabela II.3 - Coeficiente de correlação (R^2) das Formulações 4 (1 e 5%) dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.

Formulação	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
Formulação 4 (1%)	0,9963	0,9862	0,8652
Formulação 4 (5%)	0,9984	0,9801	0,8719

O modelo matemático que apresentou R^2 maior foi o de zero ordem. A Figura II.12 traz o gráfico de cinética de liberação de zero ordem das formulações e seus respectivos R^2 .

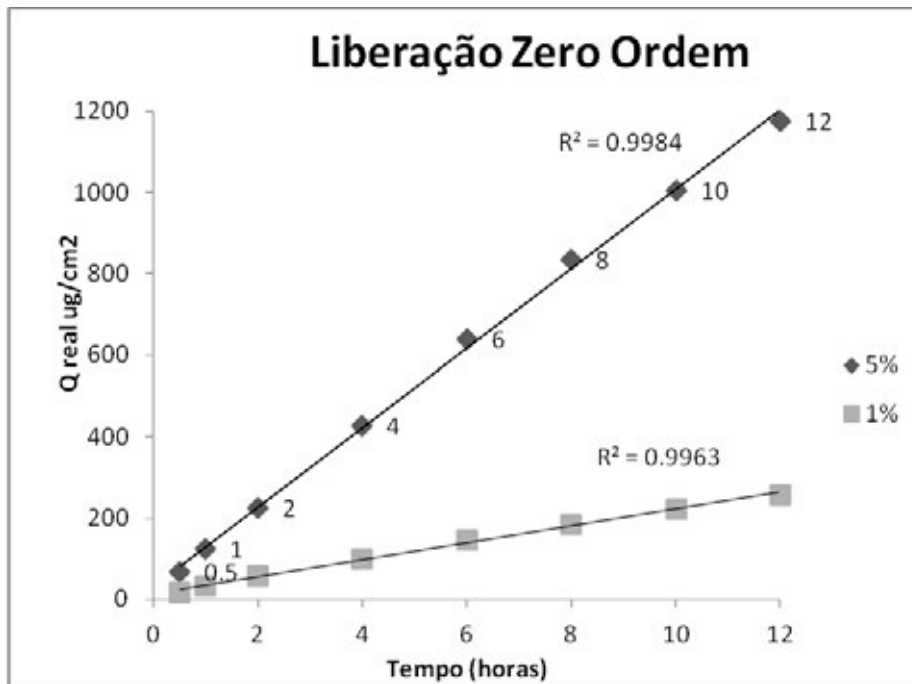


Figura II.7 - Modelo de cinética de liberação de zero ordem

O modelo matemático de zero ordem pode ser usado para descrever a liberação modificada de fármacos de várias formas farmacêuticas, como sistemas transdérmicos, formas revestidas, sistemas osmóticos, entre outros. As formas farmacêuticas que seguem essa cinética liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, o que é ideal para atingir ação farmacológica prolongada (COSTA e LOBO, 2000).

A cinética de zero ordem indica que a taxa de liberação é independente do tempo, ou seja, neste caso pode ser atribuída ao comportamento dinâmico de inchaço da fase hexagonal que controla a liberação do fármaco (FARKAS et al., 2000).

CAPÍTULO III – Avaliação da capacidade de proteção solar das formulações

III.1. Teste de FPS *in vitro*

O teste de FPS *in vitro* foi realizado no Labsphere UV – 2000S, modelo mais atual deste equipamento. Nele há um software que permite realizar estudos do protetor solar através do cálculo do FPS. Além disso, o método utilizado fornece dados referentes ao comprimento de onda (λ) crítico que é o comprimento de onda determinado no valor em que a área sob a curva de absorvância atinge valor igual a 90% da área integrada entre 290 e 400 nanômetros (BRASIL, 2010_b), entre outros aspectos envolvidos na proteção solar. A Figura III.1 ilustra um gráfico de absorvância de um protetor solar para exemplo de cálculo do λ crítico.

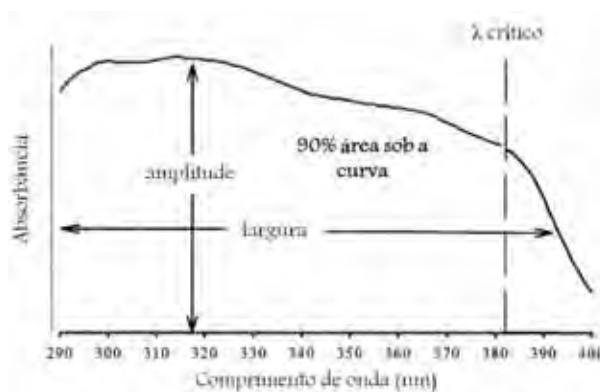


Figura III.1 - Gráfico ilustrativo de absorvância de radiação UVA e UVB para cálculo do λ crítico (DIFFEY et al., 2000).

As Figuras III.2 e III.3 mostram as curvas de absorvância em função do comprimento de onda para as formulações base II e III (Tabela I), respectivamente, com diferentes composições de xerogéis e em diferentes concentrações. As legendas das Figuras III.2 e III.3 apresentam primeiramente as letras FBII e FBIII, respectivamente, referindo-se às formulações base II e III seguida de um número que se refere a % de xerogel incorporada na formulação, seguida da sigla que representa a formulação do xerogel. Como exemplo, a formulação FBIII15P0,05H1, é uma formulação base III (**FBIII15P0,05H1**) contendo 15% (**FBIII15P0,05H1**) de xerogel P0,05H1 (**FBIII15P0,05H1**). Além dessas formulações, por fins comparativos incorporou-se 8%

de metoxinamato de octila, filtro solar orgânico e 15 % de dióxido de titânio comercial que também estão apresentados nestas duas Figuras.

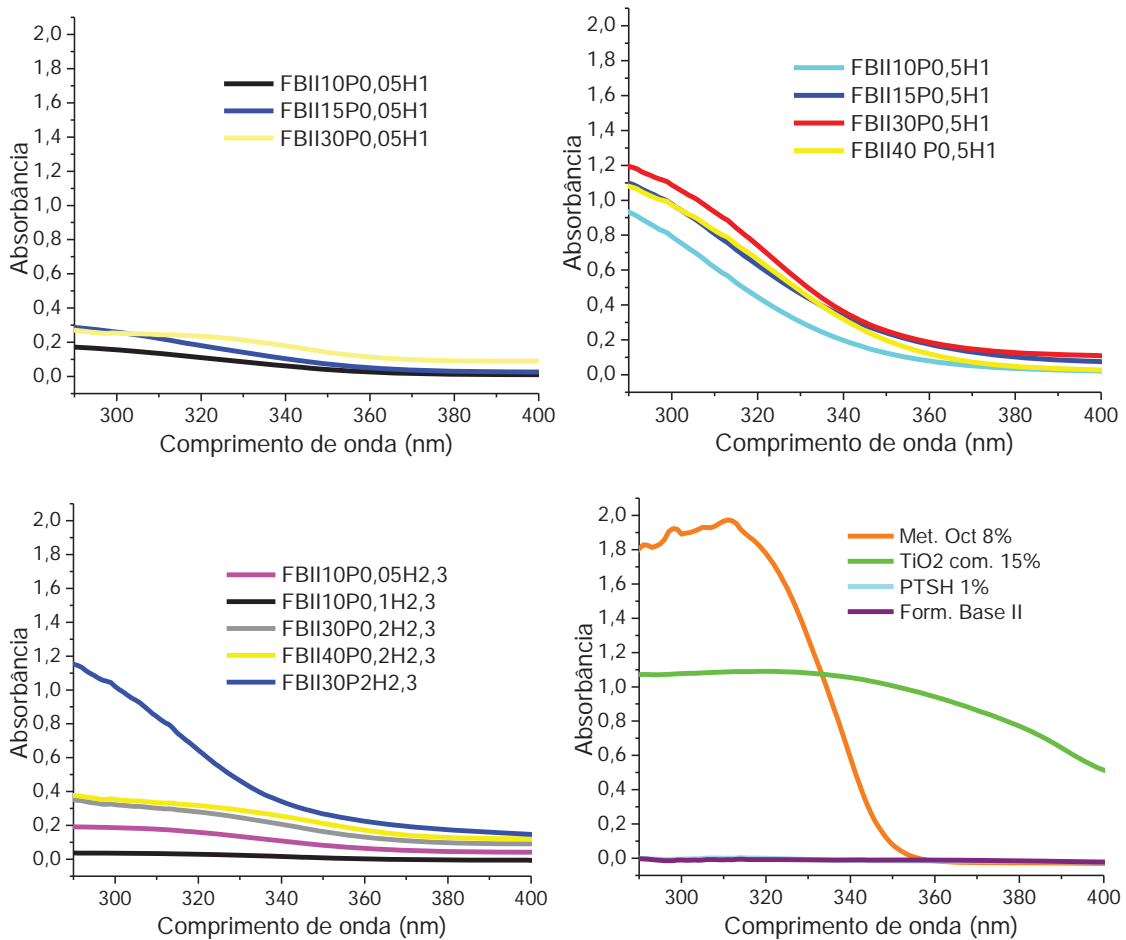


Figura III.2 - Gráfico das absorvâncias das formulações base II contendo diferentes composições e concentrações de xerogéis, TiO_2 comercial, metoxinamato de octila e de PTSH.

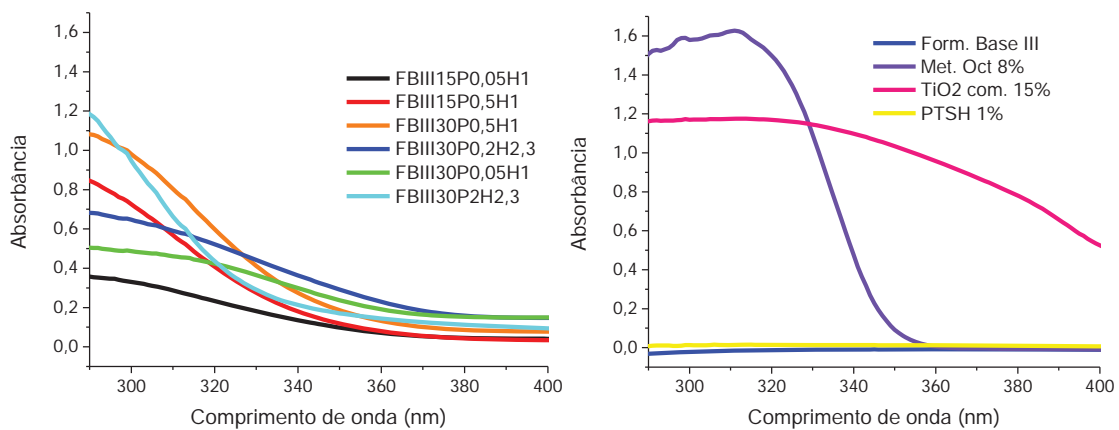


Figura III.3 - Gráfico das absorvâncias das formulações base III contendo diferentes composições e concentrações de xerogéis, TiO_2 comercial, metoxinamato de octila e PTSH.

Nota-se nas duas figuras que as formulações base sem PTSH e as formulações base contendo 1 % de PTSH têm absorvância mínima, não interferindo na absorvância

do filtro solar. Observa-se que há algumas formulações que se destacam quanto a sua amplitude proporcionando maior proteção solar. Para a Figura III.2 são elas FBII10P0,5H1, FBII15P0,5H1, FBII30P0,5H1, FBII40P0,5H1, FBII30P2H2,3, Met. Oct 8% e TiO₂ com. 15% e para Figura III.3 são FBIII15P0,5H1, FBIII30P0,5H1, FBIII30P2H2,3, Met. Oct 8% e TiO₂ com. 15%. Observa-se para as duas formulações base que os xerogeis de melhor atividade fotoprotetora são o P0,5H1 e P2H2,3.

As amostras FBII30P0,05H1, FBII30P0,2H2,3, FBII40P0,2H2,3, FBII10P0,05H2,3, FBII30P2H2,3, FBIII30P0,05H1 e FBIII30P0,2H2,3 apresentam um λ crítico > 370 nm e são consideradas de amplo espectro de proteção. Nota-se nos gráficos dessas formulações que não há uma diferença discrepante das absorbâncias entre os comprimentos de onda da região UVA (320 a 400 nm) e UVB (290 a 320 nm), diferentemente, por exemplo, das formulações FBII10P0,5H1, FBII30P0,5H1, FBIII15P0,5H1 e FBIII30P0,5H1, onde é notável uma absorbância maior nos comprimentos de onda referentes à região UVB.

A fim de compreender melhor a atividade fotoprotetora das nanopartículas de TiO₂ desenvolvidas neste projeto, comparou-se a área sob a curva (ASC) de absorbância das formulações com xerogel em relação a ASC das formulações contendo 15% de TiO₂ comercial nas faixas de comprimento de onda referentes a região UVA e UVB. Neste caso, as ASC das formulações base contendo TiO₂ comercial foram consideradas como 100% e a porcentagem das ASC das formulações base contendo xerogel em relação ao TiO₂ comercial foram calculadas usando regra de três simples. Com esses valores podemos avaliar a atividade fotoprotetora das nanopartículas em relação ao TiO₂ comercial e quanto maior a porcentagem exibida pelo xerogel, maior é a sua semelhança com a fotoproteção exibida pelo TiO₂ comercial. As Figuras III.4 e III.5 trazem os gráficos das porcentagens da ASC de xerogeis em diferentes concentrações em relação ao TiO₂ comercial a 15% incorporados na formulação base II e III, respectivamente, juntamente com o valor do λ crítico de cada formulação.

Na Figura III.4 podemos observar que o aumento da quantidade de xerogel provoca um aumento da % da ASC em relação ao TiO₂ comercial. Somente o xerogel P0,5H1 a 40% não apresentou esse comportamento. Dentre as formulações apresentadas da Figura III.4, a que apresentou maior atividade fotoprotetora na região UVA e UVB foi a P0,5H1 a 30%.

O comprimento de onda crítico é muito relevante, pois a formulação que apresenta um valor de λ crítico maior que 370 nm é considerada de amplo espectro de

proteção. A Figura III.4 mostrou que os valores de λ crítico se elevaram com o aumento da quantidade de xerogel e a exceção se deu somente para o xerogel P0,5H1 a 40%. Nesta figura, as formulações que apresentaram amplo de espectro de proteção foram as que continham o xerogel P0,2H2,3 (a 30 e 40%) e P0,05H1 a 30%.

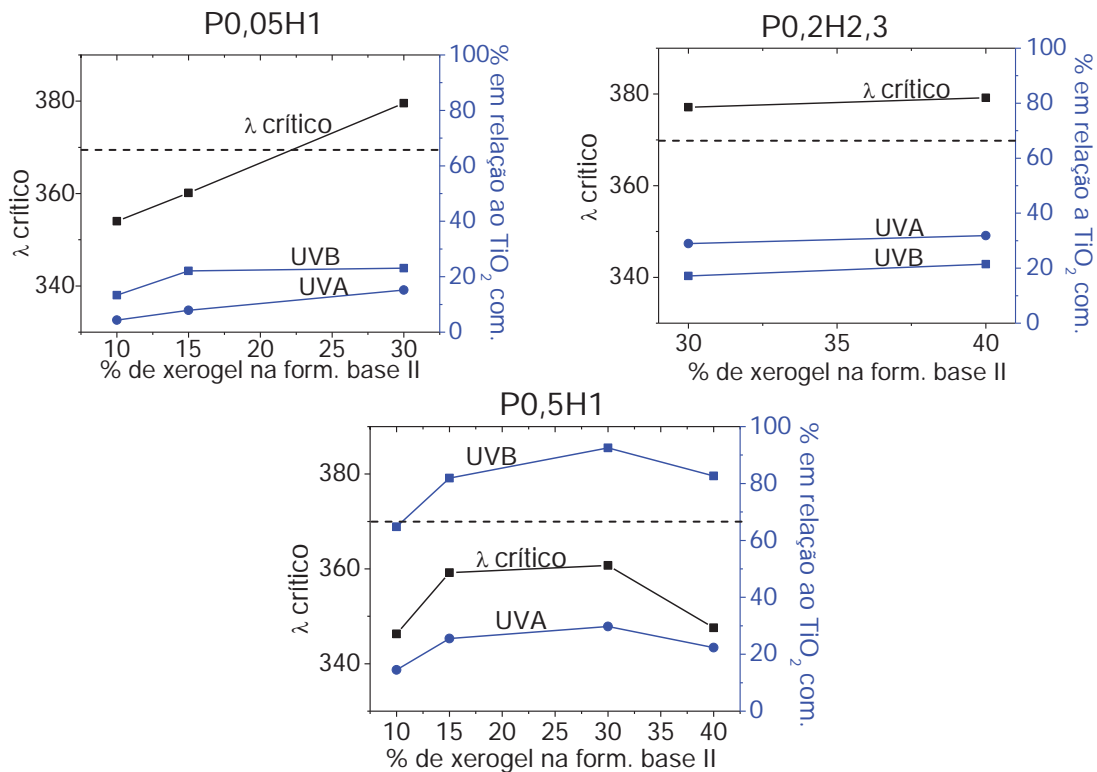


Figura III.4 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base II contendo xerogel em diferentes concentrações em relação a formulação contendo TiO_2 comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

Na Figura III.5 só é possível fazer a relação de aumento da porcentagem de xerogel com aumento de porcentagem de fotoproteção e valor de λ crítico com o xerogel P0,05H1. Já o xerogel P0,5H1 apresentou comportamento inverso que pode ser explicado pelo excesso de modificador de superfície (PTSH) que causa uma diminuição acentuada no tamanho das partículas. Observa-se ainda nesta figura, que somente a formulação com P0,05H1 a 30 % apresentou amplo espectro de proteção.

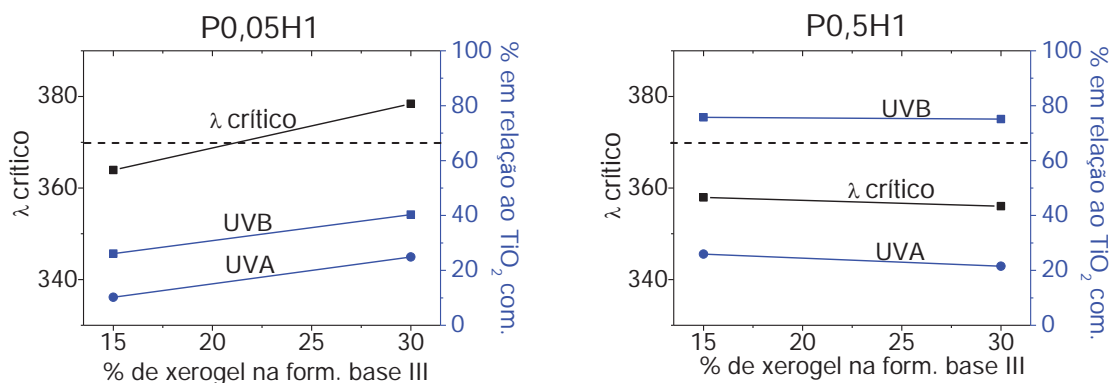


Figura III.5 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base III contendo xerogel em diferentes concentrações em relação a formulação contendo TiO₂ comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

Avaliou-se também a diferença da razão molar de PTSH/Ti (P) dos xerogéis em relação à atividade fotoprotetora. A Figura III.6 traz os gráficos das porcentagens da ASC de xerogéis a 30% em relação ao TiO₂ comercial a 15% incorporados na formulação base II e III, juntamente com o valor do λ crítico de cada formulação.

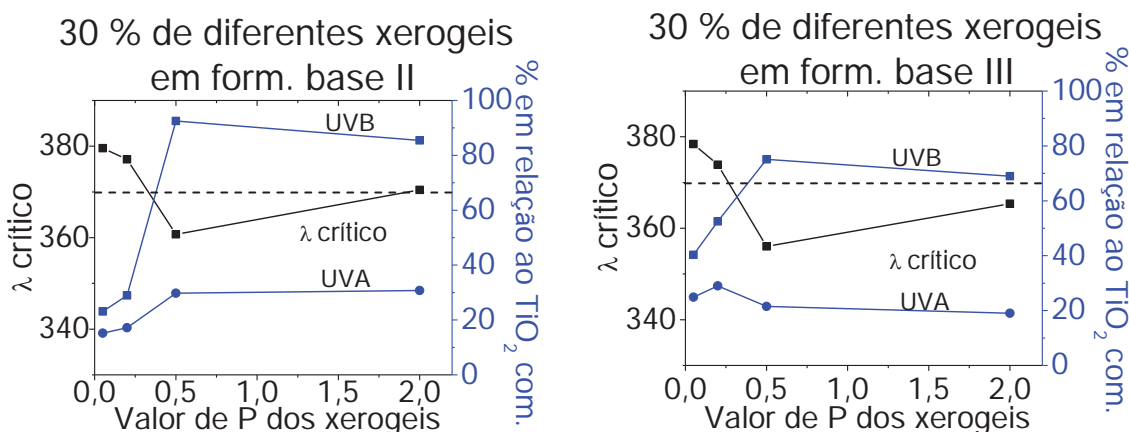


Figura III.6 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base II (à esquerda) e III (à direita) contendo xerogel a 30% em relação a formulação contendo TiO₂ comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

Observa-se na Figura III.6 que para região UVB há um aumento da fotoproteção em relação ao TiO₂ comercial com o aumento de P até a razão 0,5 e após este valor não são observadas variações significativas. Já para região UVA, na formulação base II quanto maior P maior a fotoproteção e na formulação base III houve aumento da fotoproteção até P = 0,2 seguida não são observadas variações significativas. Em relação ao λ crítico, observa-se para formulações preparadas com altas concentrações de modificador de superfície (altos valores de P) valores abaixo de 370nm, ou seja, a

formulação perde sua característica de amplo espectro de proteção. Como valores altos de P promovem a diminuição dos tamanhos de partícula, acredita-se que o valor de λ crítico e a propriedade de amplo espectro de proteção estejam relacionados com o tamanho das nanopartículas. Nanopartículas muito pequenas devem ser as responsáveis pelo baixo valor de % de fotoproteção e pela perda da capacidade de proteção na região UVA o que causa a perda da propriedade de amplo espectro de proteção solar. Com esses dados, dentre as formulações apresentadas na Figura III.6 pode-se propor que a formulação base II com P2H2,3 exibe melhor fotoproteção por (i) apresentar λ crítico acima de 370 nm sendo de amplo espectro de proteção, (ii) apresentar melhor proteção na região UVA, comparando-se entre os xerogeis utilizados e (iii) apresentar proteção na região UVB de quase 90% em relação ao TiO₂ comercial.

III.2. Reflectância difusa

A reflectância difusa é definida como reflexões múltiplas, regulares e difusas, da superfície de pequenas partículas que compõe o material. Na reflexão difusa, uma parte do fluxo incidente que penetra no interior da amostra retorna à sua superfície e outra parte sofre absorção parcial e espalhamentos múltiplos de cada partícula que compõe a amostra. Portanto, a reflexão difusa é atenuada pelo fenômeno da absorção (WENDLANDT e HECHT, 1996). A reflectância difusa tem sido utilizada na caracterização do dióxido de titânio como, por exemplo, na comparação das diferentes fases do dióxido de titânio (VASIL'EVA et al., 2009); Behadur e colaboradores estudaram o dióxido titânio recobrando nanopartículas de óxido de zinco quanto ao seu comportamento de absorção na região UV e a sua transparência na região visível (BEHADUR et al., 2010). Neste trabalho esta técnica é uma ferramenta usada para compreender melhor a atividade fotoprotetora das nanopartículas de TiO₂, assim como sua transparência.

Para poder visualizar melhor as medidas de reflectância difusa e comparar os resultados obtidos, foram feitos vários gráficos conforme as regiões da radiação ultravioleta.

As Figuras III.7 e III.8 apresentam os gráficos de reflectância das amostras contendo 30% de xerogel incorporadas nas formulações base II e III, respectivamente. Nos dois gráficos, além das formulações com os xerogeis, há formulações contendo 15% dióxido de titânio comercial e 8% de metoxinamato de octila, filtro solar orgânico,

a fim comparar melhor a atividade fotoprotetora das nanopartículas de TiO_2 obtidas neste projeto.

Nestas figuras ficam evidentes que as formulações contendo dióxido de titânio comercial têm uma reflectância mais acentuada na região da radiação visível (400-700 nm), mostrando que as nanopartículas obtidas através do processo sol-gel utilizadas neste projeto conferem um aspecto mais transparente ao produto. A transparência está sempre relacionada com a reflectância da radiação na região visível: quanto menor a reflectância, maior a transparência.

De forma geral, há uma diminuição da reflectância nas regiões UVB e UVA I, e isso possivelmente se deve ao fato do dióxido de titânio absorver a radiação UV com maior intensidade nesta faixa do espectro.

Em relação ao metoxinamato de octila, é bem perceptível que sua atividade fotoprotetora se dá somente pela absorbância da radiação UV, sendo quase nula sua reflectância, como o esperado para essa classe de fotoprotetores. Somente quando o metoxinamato de octila é incorporado na base com ceteth-10 que ele apresentou reflectância significativa na região UVA II, mas esta se deve a reflectância da formulação base III (ceteth-10, palmitato de isopropila e água), vista nas Figuras III.9 e III.10.

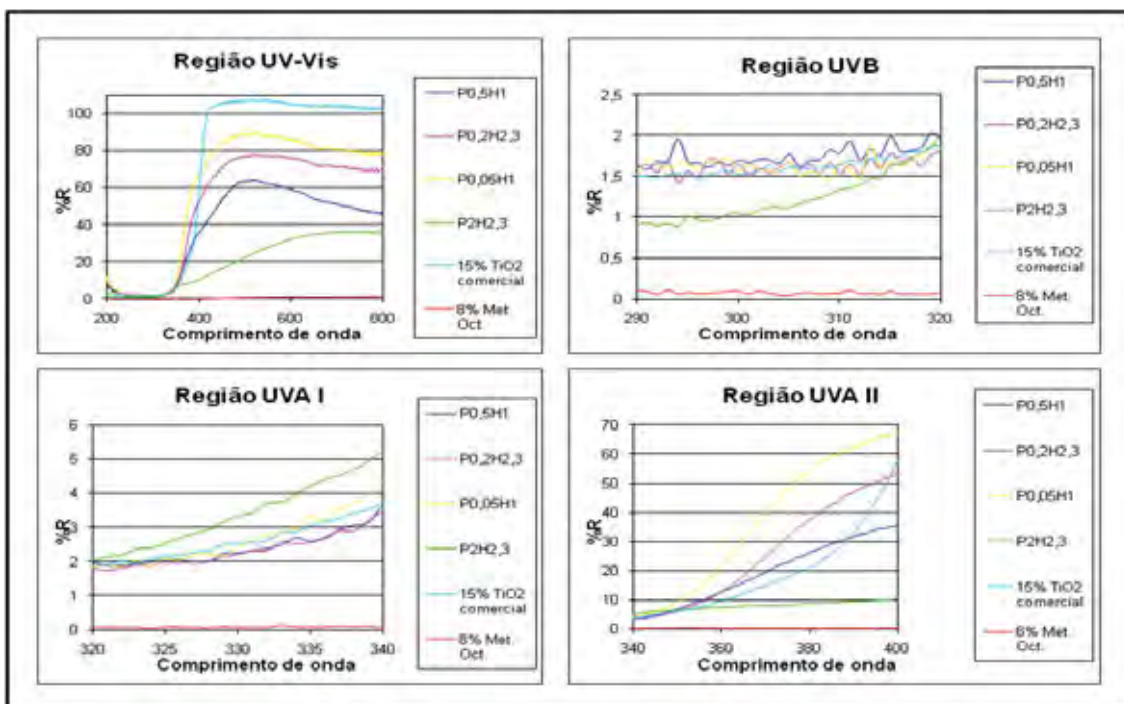


Figura III.7 - Gráficos da reflectância difusa de amostras contendo 30% de xerogel na formulação base II.

Na Figura III.7, olhando para a Região UV-Vis observa-se uma diferença na transparência das formulações contendo os xerogeis na seguinte ordem: P2H2,3 > P0,5H1 > P0,2H2,3 > P0,05H1. Na região UVB, quase todas as formulações têm a mesma reflectância, somente a P2H2,3 que reflete menos. Na região UVA I ocorre uma inversão em relação à UVB: a formulação com P2H2,3 reflete mais que as outras. A região UVA II assemelha-se como a região visível sendo a ordem de reflectância: P2H2,3 < P0,5H1 < P0,2H2,3 < P0,05H1.

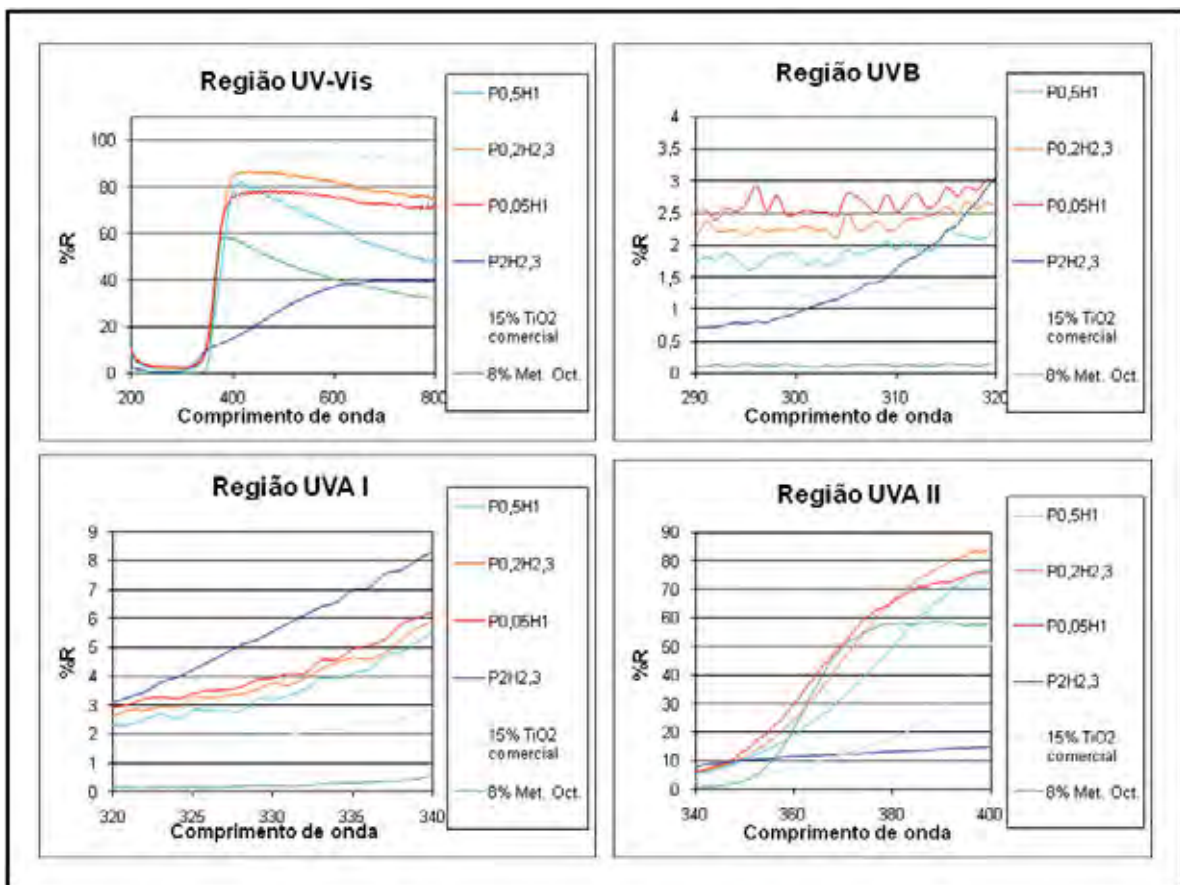


Figura III.8 - Gráficos da reflectância difusa de amostras contendo 30% de xerogel na formulação base III.

Com a formulação base III mostrada na Figura III.8, nota-se outra ordem de transparência com os xerogeis incorporados a 30%: P2H2,3 > P0,5H1 > P0,05H1 > P0,2H2,3. Na região UVB, na maior parte de sua extensão, apresentaram maior reflectância as amostras contendo menor quantidade de PTSH. As amostras apresentaram reflectância parecida na região UVA I, sendo mais acentuada a formulação contendo P2H2,3.

Cabe ressaltar que a ordem de transparência obtida através dos resultados da reflectância difusa é compatível com a Figura II.4 que ilustra as formulações sobre uma superfície azul, onde a transparência das formulações aumenta com concentração de PTSH nas composições dos xerogéis e a formulação com o TiO_2 de uso comercial é mais branca.

As Figuras III.9 e III.10 trazem os gráficos das formulações com P0,05H1 e P0,5H1, respectivamente, variando as concentrações dos xerogéis na formulação base III. Em todos os comprimentos de onda, formulações contendo P0,05H1, quanto maior sua concentração, maior a reflectância. O mesmo não pode ser observado com as formulações contendo P0,5H1: somente no Visível essa relação pode ser estabelecida.

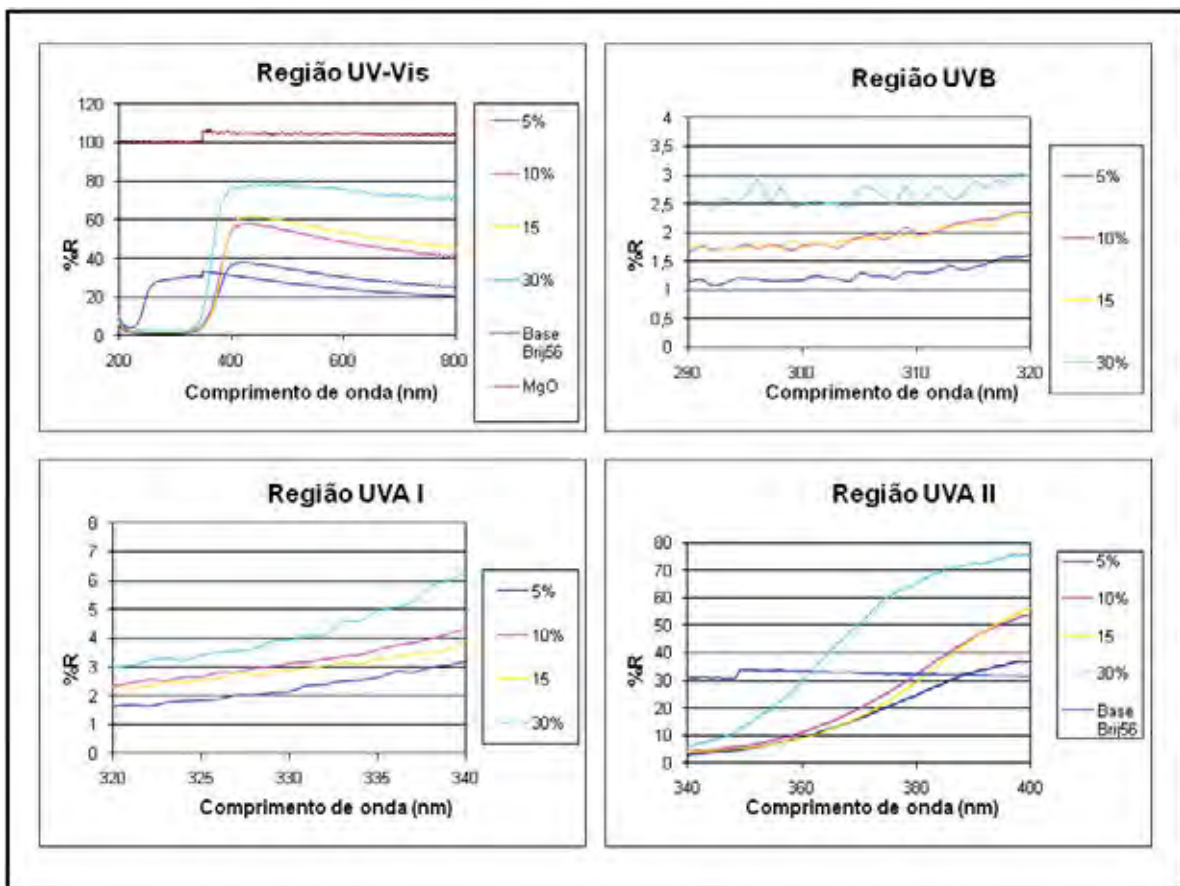


Figura III.9 - Gráficos da reflectância difusa de amostras contendo xerogel P0,05H1 na formulação base III.

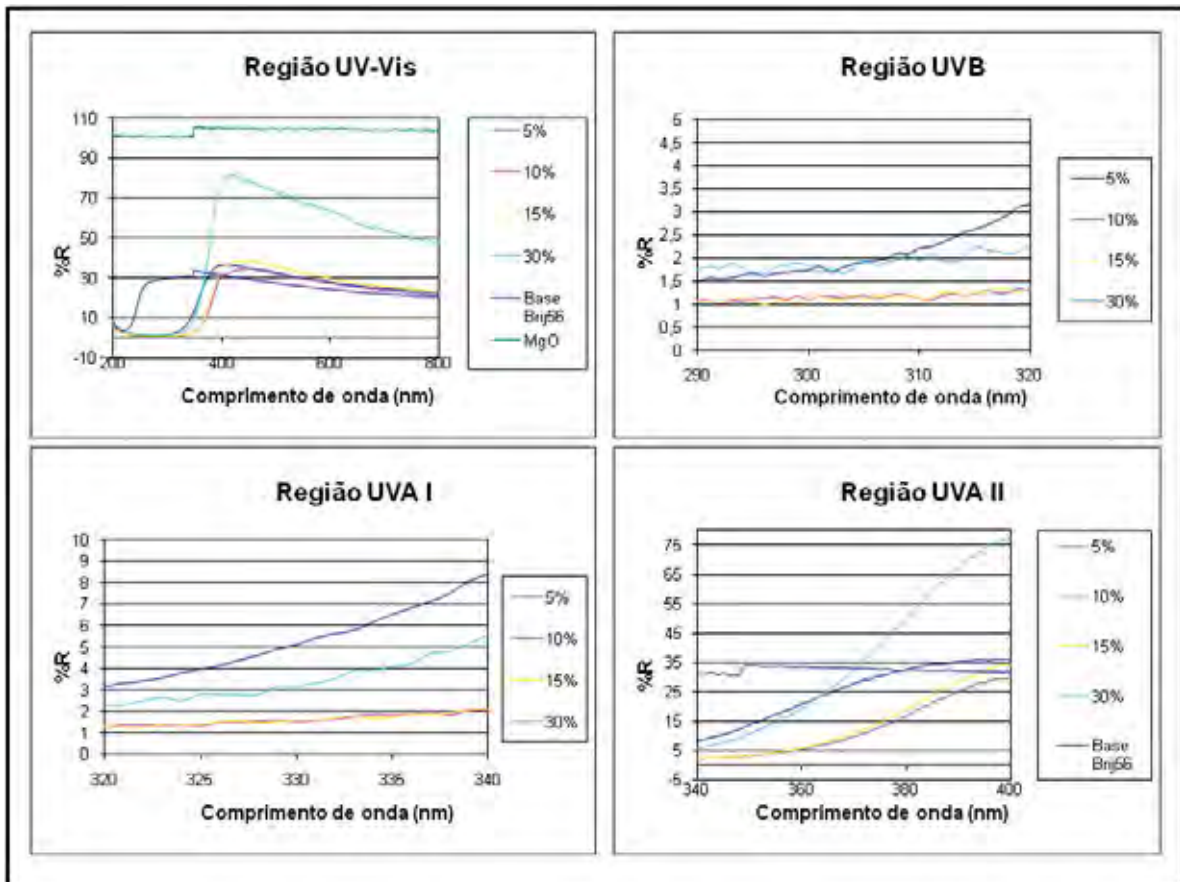


Figura III.10 - Gráficos da reflectância difusa de amostras contendo xerogel P0,5H1 na formulação base III.

As Figuras III.11 e III.12 ilustram as formulações contendo os mesmos xerogéis da Figura III.9 e III.10, respectivamente, porém em formulações base II. Nota-se para os dois xerogéis que quanto maior a concentração do xerogel, maior a reflectância somente no Visível e na região UVA II.

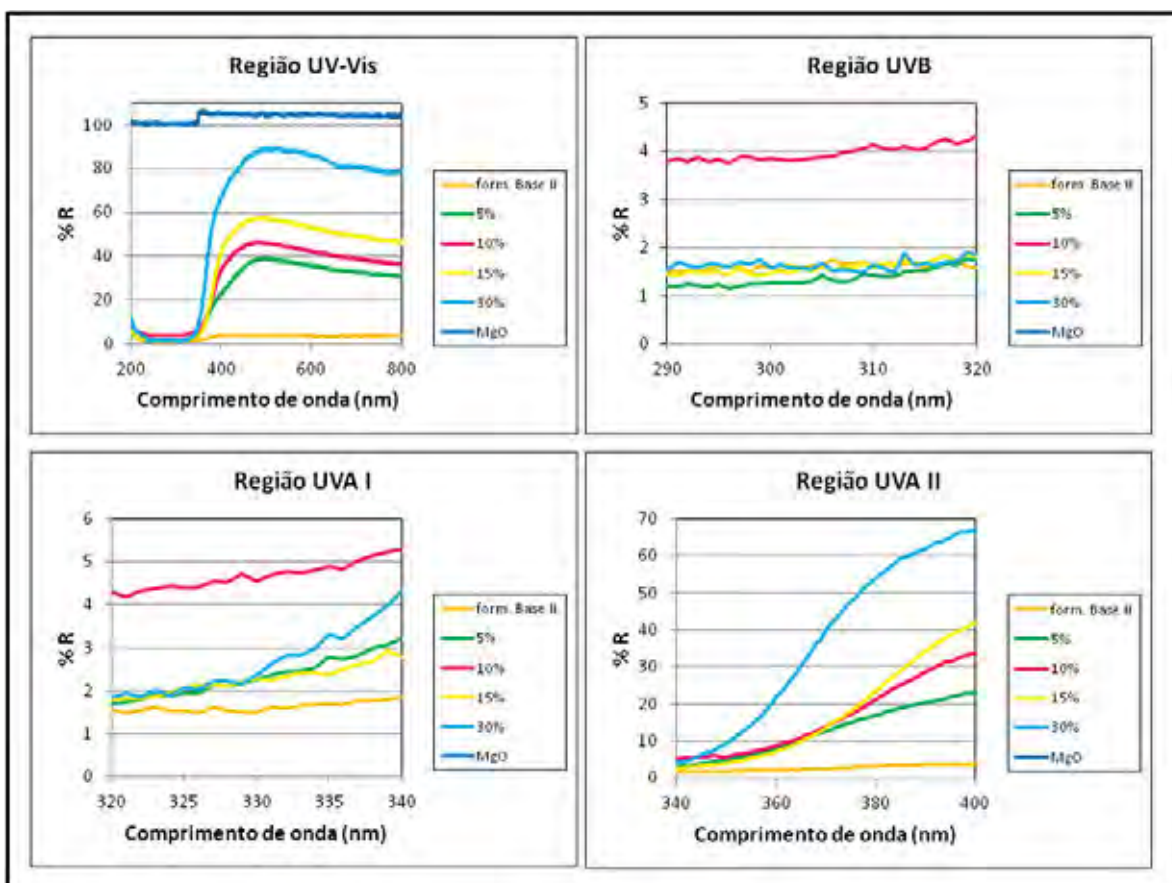


Figura III.11 - Gráficos da reflectância difusa de amostras contendo xerogel P0,05H1 na formulação base II.

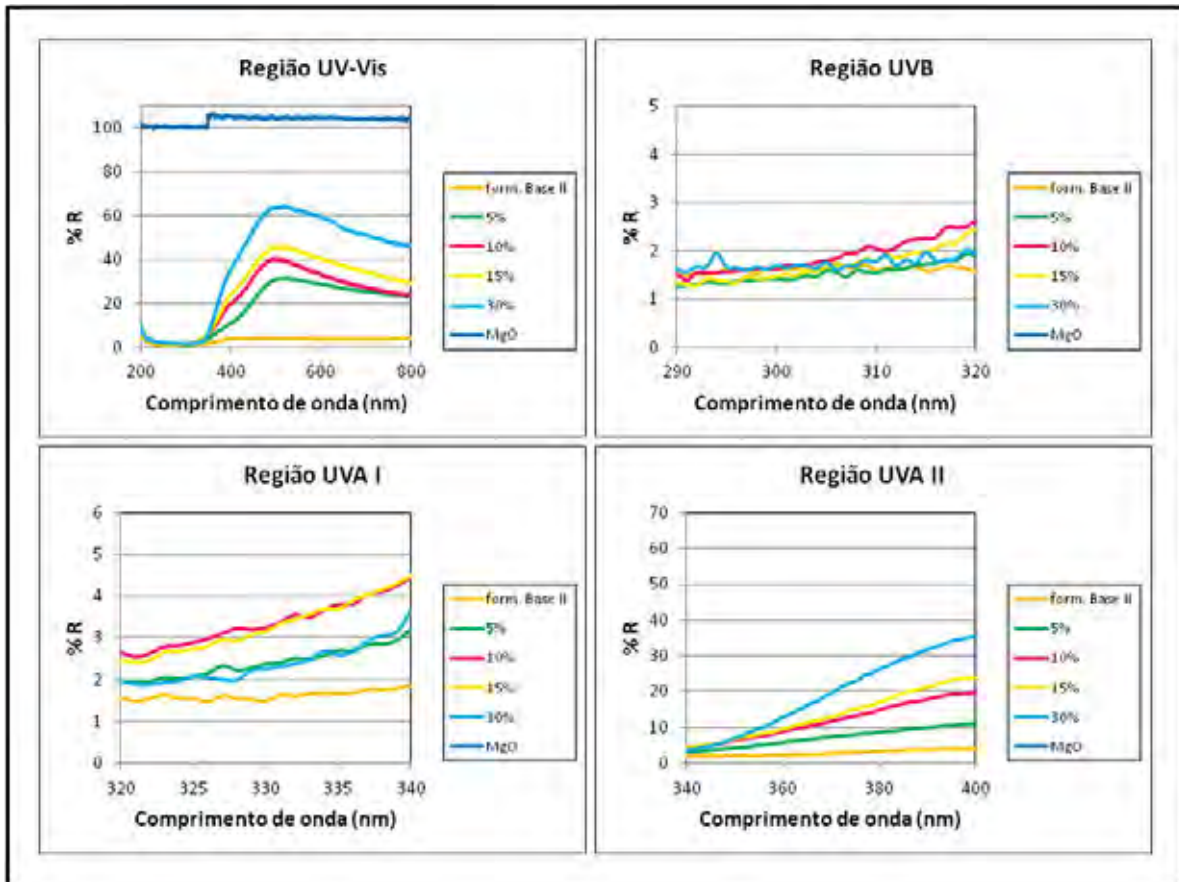


Figura III.12 - Gráficos da refletância difusa de amostras contendo xerogel P0,5H1 na formulação base II.

III.3. Comparação da atividade fotoprotetora de xerogéis com e sem tratamento térmico

Com os resultados apresentados anteriormente pode-se perceber que a atividade fotoprotetora dos xerogéis sintetizados foi menor do que a do dióxido de titânio comercial, principalmente quando se refere à região UVA. Por isso, foram incorporados nas formulações base II e III xerogéis que passaram previamente por um tratamento térmico a 450 °C com o intuito de aumentar o tamanho das partículas a valores altos o suficiente para otimizar seu efeito de proteção solar mas não tão altos a ponto de tornar os sistemas opacos. As Figuras III.13 e III.14 apresentam os gráficos comparando as curvas de absorvância em função do comprimento de onda para as formulações base II e III, respectivamente, contendo 30% dos xerogéis antes e após tratamento térmico a 450 °C. Nestas Figuras os espectros são comparados com aqueles obtidos para a formulação base com dióxido de titânio comercial a 15%.

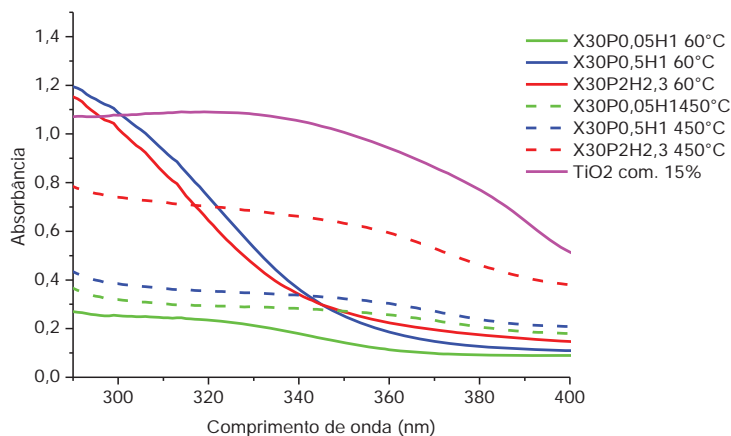


Figura III.13 - Gráfico das absorvâncias das formulações base II contendo 30 % de xerogéis com tratamento térmico a 450 °C, sem tratamento térmico (seco a 60 °C) e com 15% de dióxido de titânio comercial.

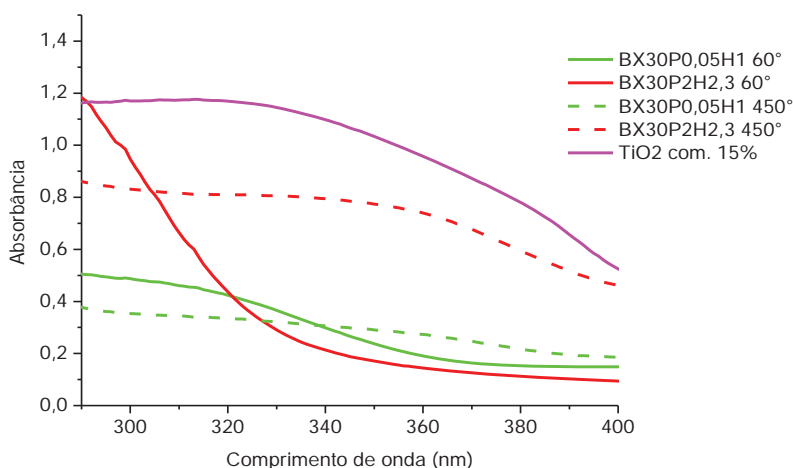


Figura III.14 - Gráfico das absorvâncias das formulações base II contendo 30 % de xerogéis com tratamento térmico a 450 °C, sem tratamento térmico (seco a 60 °C) e com 15% de dióxido de titânio comercial.

Na Figura III.13 pode-se observar que para o xerogel P0,05H1 houve uma absorvância mais significativa após o tratamento térmico nas regiões UVA e UVB. Para os demais xerogéis a 450 °C, também houve um aumento da absorvância na região UVA, sendo o inverso somente na região UVB. Na Figura III.14 nota-se o mesmo comportamento destes últimos a 450 °C, ou seja, um aumento da absorvância na região UVA e uma diminuição na região UVB. Entretanto, com o xerogel P2H2,3 na extensão da região UVB ocorre diminuição e aumento da absorvância em relação ao xerogel sem tratamento térmico.

A mesma comparação com a ASC das formulações com xerogel em relação à ASC das formulações com TiO₂ comercial foi feita como descrito no item III.1 deste capítulo. As Figuras III.15 e III.16 trazem os gráficos das formulações base II e III,

respectivamente, com a comparação da ASC dos xerogéis com tratamento térmico a 450 °C e sem tratamento térmico (seco a 60 °C) a 30% em relação a ASC do TiO₂ comercial a 15%.

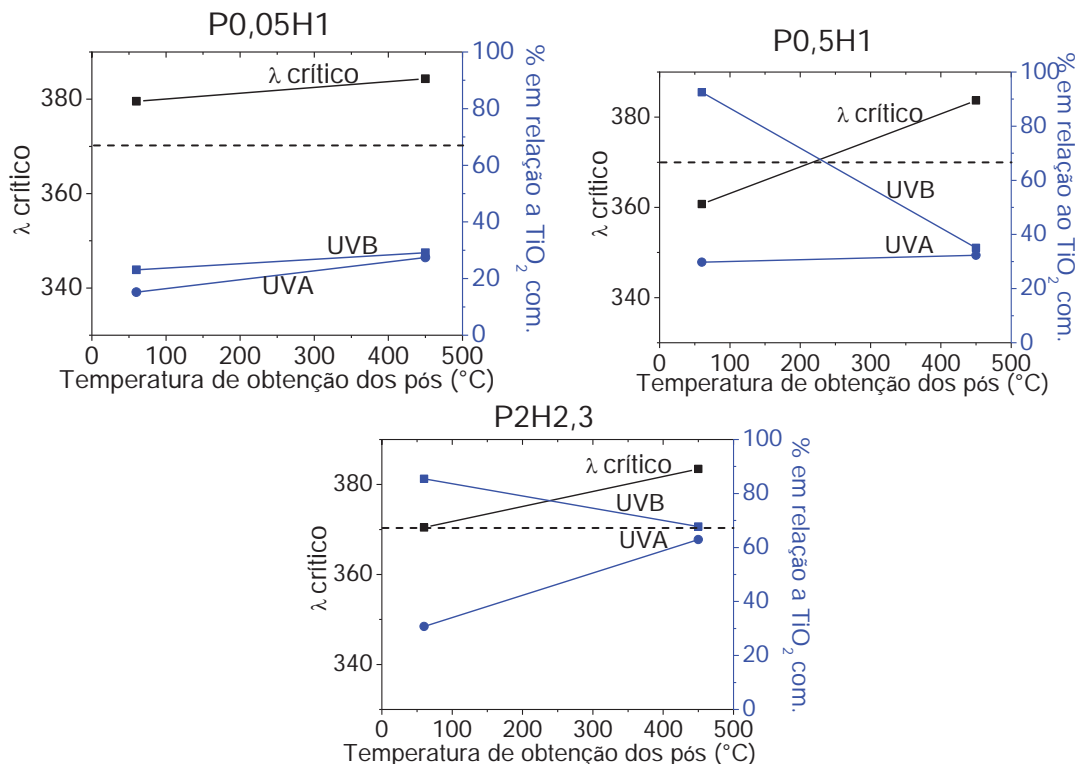


Figura III.15 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base II contendo xerogel a 30% com tratamento térmico a 450 °C e sem tratamento térmico (seco a 60 °C) em relação a formulação contendo TiO₂ comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

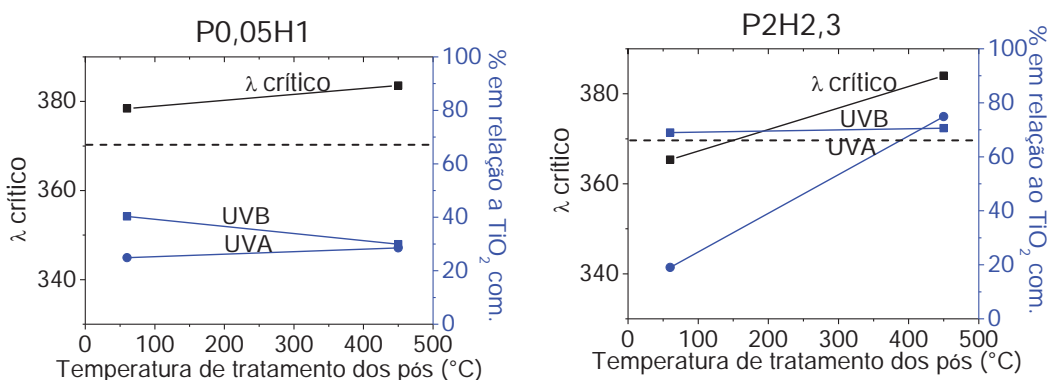


Figura III.16 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base III contendo xerogel a 30% com tratamento térmico a 450 °C e sem tratamento térmico (seco a 60 °C) em relação a formulação contendo TiO₂ comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

A Figura III.15 apresenta resultados com o mesmo comportamento observado na Figura III.13, ou seja, em todas formulações ocorre uma diminuição da ASC em relação ao TiO_2 na região UVB e um aumento na região UVA, exceto com o xerogel P0,05H1 que apresenta aumento da região UVA e UVB. Observa-se também que todas as formulações com xerogel a $450\text{ }^\circ\text{C}$ apresentam λ crítico mais elevado que as formulações com xerogel sem tratamento térmico.

A Figura III.16 também tem seus resultados semelhante com a figura III.14, ou seja, há um aumento da fotoproteção na região UVA e diminuição na região UVB em relação ao TiO_2 comercial para ao xerogel P0,05H1. Já para o xerogel P2H2,3 houve aumento da fotoproteção nas duas regiões, sendo na região UVA mais acentuado. Para os dois xerogéis há um aumento do λ crítico com o a incorporação de xerogel com tratamento térmico na formulação base III.

A Figura III.17 traz os gráficos das porcentagens da ASC de xerogéis com tratamento térmico a $450\text{ }^\circ\text{C}$ a 30% em relação ao TiO_2 comercial a 15% incorporados na formulação base II e III, juntamente com o valor do λ crítico de cada formulação, a fim de avaliar a diferença da razão molar de PTSH/Ti (P) dos xerogéis em relação à atividade fotoprotetora das formulações.

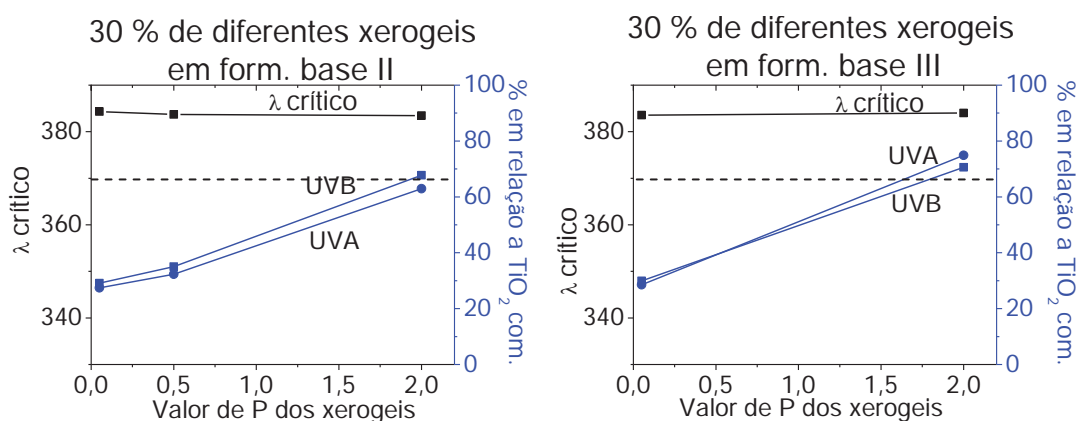


Figura III.17 - Gráfico da porcentagem da área sob a curva das formulações base II (à esquerda) e III (à direita) contendo xerogel a 30% com tratamento térmico a $450\text{ }^\circ\text{C}$ em relação a formulação contendo TiO_2 comercial a 15% e seus respectivos comprimento de onda crítico.

Nota-se na Figura III.17 que para as duas formulações base quanto maior o valor de P maior é a % da ASC em relação ao TiO_2 comercial tanto na região UVA quanto na região UVB. O λ crítico praticamente não alterou seu valor, sendo a diferença de 1 nm

de alteração para valores maiores de P na formulação base II e diferença de 0,5 nm para valores maiores de P na formulação base III. Portanto, para os xerogeis com tratamento térmico quanto maior a razão P maior a atividade fotoprotetora.

Análises de reflectância difusa também foram realizadas para essas amostras, a fim de analisar a transparência dos xerogeis com tratamento térmico e a atividade fotoprotetora proveniente da capacidade refletora da radiação UV das nanopartículas. As Figuras III.18 e III.19 apresentam os gráficos das formulações base II e III, respectivamente, contendo diferentes xerogeis com tratamento térmico a 450 °C a 30%, sem tratamento térmico (seco a 60°C) a 30% e TiO₂ comercial a 15%.

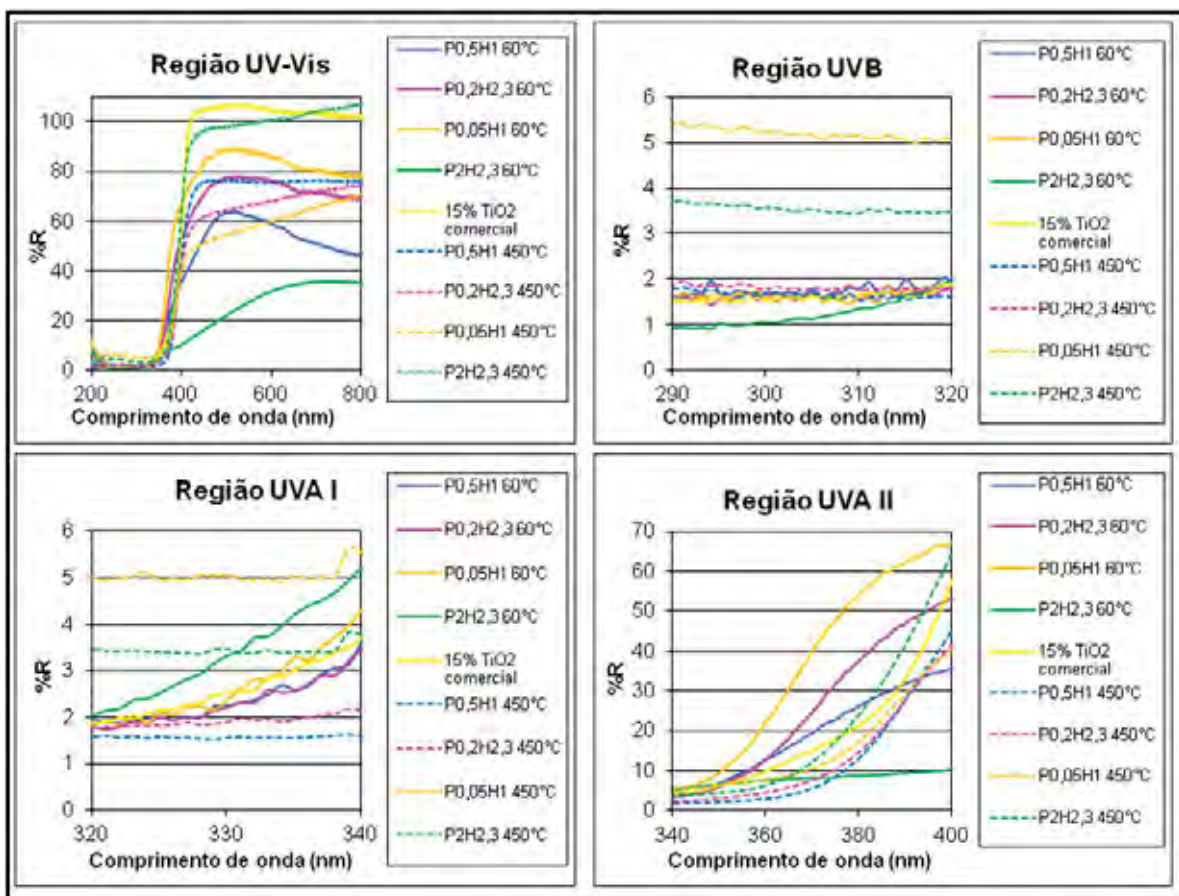


Figura III.18 - Gráficos da reflectância difusa de amostras das formulações base II contendo 30 % de xerogeis com tratamento térmico a 450 °C, sem tratamento térmico (seco a 60 °C) e com 15% de dióxido de titânio comercial.

Como a transparência das nanopartículas está relacionada com o seu tamanho, seria esperado um aumento da reflectância difusa na região visível das amostras contendo xerogeis com tratamento térmico, já que estes devem apresentar tamanho de

partículas maiores que a dos xerogeis secos a 60 °C. Na Figura III.18 pode ser observado que os xerogeis com tratamento térmico P0,5H1 e P2H2,3 apresentaram maior reflectância na região visível do que os xerogeis sem tratamento térmico. Já os xerogeis com tratamento térmico P0,02H2,3 e P0,05H1 apresentaram menor reflectância do que os xerogeis sem tratamento térmico. Além disso, a ordem de transparência dos xerogeis com tratamento térmico foi inversa às dos xerogeis sem tratamento térmico: P0,05H1>P0,2H2,3>P0,5H1>P2H2,3, ou seja, quanto mais ácido nas nanopartículas menor transparência apresentada pelas formulações. Cabe ressaltar que todos os xerogeis são mais transparentes que o TiO₂ comercial, somente o P2H2,3 apresenta reflectância maior em uma pequena região do espectro entre 700 e 800 nm que está no limite da região visível do espectro. Visualmente todas as formulações obtidas com os xerogeis tratados termicamente são transparentes.

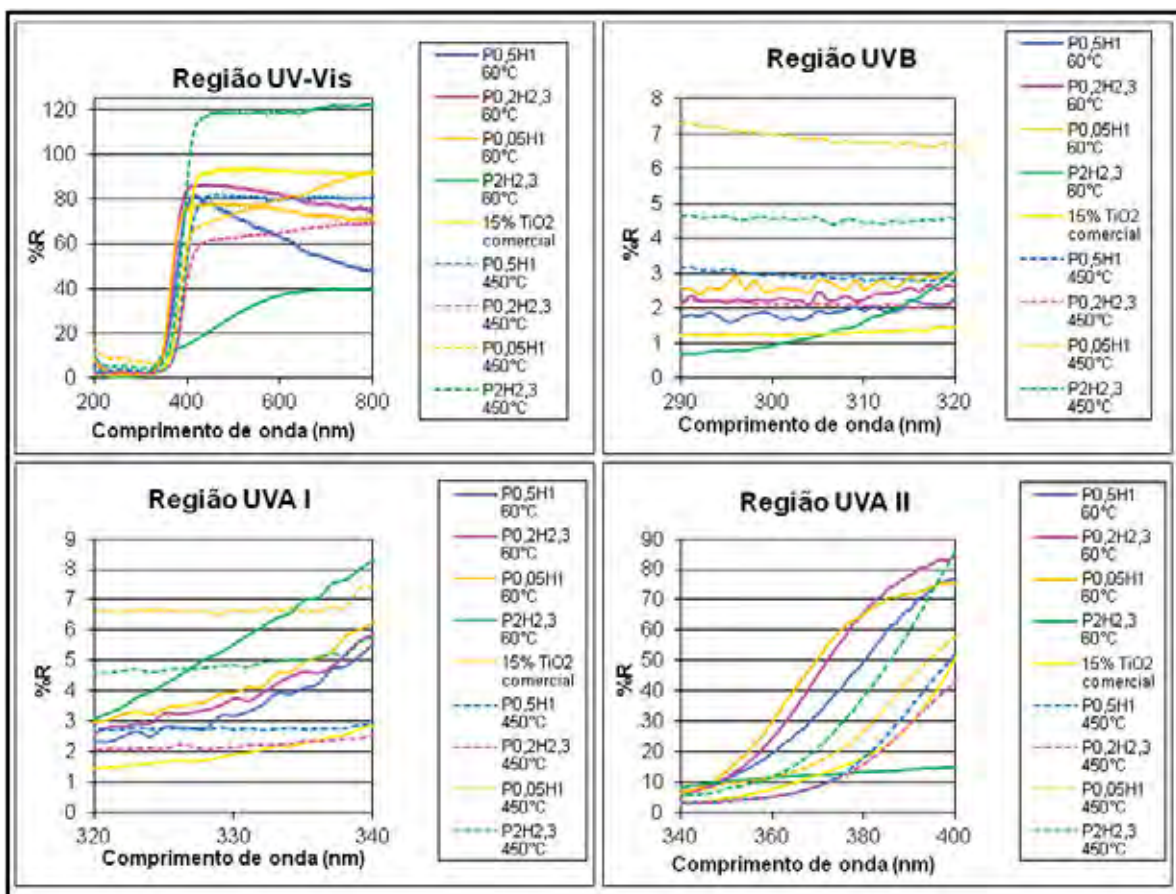


Figura III.19 - Gráficos da reflectância difusa de amostras das formulações base III contendo 30 % de xerogeis com tratamento térmico a 450 °C, sem tratamento térmico (seco a 60 °C) e com 15% de dióxido de titânio comercial.

Para as formulações preparadas pela adição das nanopartículas após tratamento térmico à base III, observa-se que não é possível estabelecer uma relação direta e linear entre o valor da razão P e a transparência das formulações. Algumas formulações refletiram mais na região visível do espectro e outras menos. Esse comportamento pode ser atribuído a uma relação complexa entre as características estruturais da matriz líquido-cristalina (tamanho dos cilindros, espessura das paredes dos cilindros, entre outras), o tamanho das partículas e suas interações com a matriz. Para melhor compreender esses efeitos estudos estruturais mais completos seriam necessários.

Através dos dados obtidos com o Labsphere, de forma geral, podemos afirmar que o tratamento térmico provocou melhorias da fotoproteção das formulações na região UVA. Isso se deve provavelmente a modificação do tamanho das nanopartículas com a eliminação de material orgânico proveniente da reação sol-gel, proporcionando aumento do tamanho das nanopartículas. Com isso, modifica-se o comprimento de onda que as nanopartículas atenuam a radiação. Neste caso, este aumento do tamanho das nanopartículas promoveu aumento do valor do λ crítico apresentado pelas formulações, sendo todas de amplo espectro de proteção. Além disso, foi possível observar que o aumento da razão P entre os xerogeis proporcionou aumento da % ASC em relação ao TiO₂ comercial tanto na região UVA quanto na região UVB.

Em relação à transparência das amostras, somente com a formulação base II foi possível fazer uma comparação entre o valor de P e a ordem de transparência. Não foi possível, porém, afirmar que todas as formulações contendo xerogel com tratamento térmico são menos transparentes do que as formulações com xerogel sem tratamento térmico, como era o esperado. Entretanto, a maioria das formulações com xerogeis são mais transparentes que com o TiO₂ comercial.

6. Conclusões

Através do teste de citotoxicidade “*in vitro*”, conclui-se que as nanopartículas de TiO₂ sob a forma de xerogel não são citotóxicas para as duas linhagens celulares testadas: queratinócitos de pele humana e fibroblastos de pulmão humano. Portanto, há resultados favoráveis para seu uso em aplicação tópica quando incorporado em bases cosméticas.

Pode-se determinar uma faixa de pH entre 5 e 7 ideal para não irritar a pele e evitar aglomeração das nanopartículas de TiO₂. O potencial zeta dessa faixa é negativo e positivo e, portanto, as forças repulsivas são superiores as forças atrativas.

As formulações líquido-cristalinas obtidas com os tensoativos álcool cetílico etoxilado e propoxilado e ceteth-10 incorporaram até 40% de xerogel. Pelas caracterizações físico-químicas nota-se que a presença das nanopartículas de TiO₂ não desorganiza o arranjo líquido-cristalino.

Foi possível adicionar terpinem-4-ol na concentração de 1 e 5% nas formulações testadas, entretanto, somente as formulações base II apresentaram estrutura organizada nas medidas de microscopia de luz polarizada após a adição do fármaco.

O teste de liberação *in vitro* mostrou que as formulações 4 contendo 1 e 5% de terpinem-4-ol liberaram 13,5 e 12,4 % de terpinem-4-ol em 24 horas, respectivamente, e apresentaram como melhor modelo matemático o de zero ordem para o perfil de liberação das formulações analisadas, revelando que as formulações líquido-cristalinas contendo xerogel e terpinem-4-ol liberam a mesma quantidade de terpinem-4-ol por unidade de tempo, o que é ideal para atingir ação farmacológica prolongada.

As medidas de FPS *in vitro* revelaram de forma geral que os xerogeis sem tratamento térmico (i) apresentam maior semelhança na atividade fotoprotetora com TiO₂ comercial na região UVB do que na região UVA, (ii) não apresentaram relação do valor de P com a atividade fotoprotetora e (iii) quanto maior a concentração de xerogel maior a atividade fotoprotetora. Já para os xerogeis com tratamento térmico (i) houve uma melhora da atividade fotoprotetora na região UVA e do valor do λ crítico, (ii) quanto maior o valor de P, maior a fotoproteção e (iii) todos apresentaram amplo espectro de proteção. Com os resultados de reflectância pode-se concluir para os xerogeis sem tratamento térmico que quanto maior a concentração de PTSH na formulação do xerogel, maior transparência das formulações, ou seja, menor a reflectância na região do visível, sendo todos mais transparentes que o dióxido de

titânio comercial. Para os xerogeis com tratamento térmico, (i) pode ser feita a relação de P com a transparência somente quando incorporados na formulação base II: quanto maior P menor a transparência; (ii) a maioria das formulações se apresentaram mais transparentes que o dióxido de titânio comercial. O conjunto de resultados apresentados permite um aprofundamento na compreensão do efeito do tamanho das partículas nas propriedades relacionadas ao amplo espectro de proteção das formulações, dados que não estão claros na literatura científica. Observou-se que tamanhos de partículas maiores promovem uma maior atenuação da radiação na região UVA sem um comprometimento significativo sobre a atenuação na região UVB, o que causa um efeito de amplo espectro de proteção.

7. Referências

ALLEN, N. S.; EDGE, M.; ORTEGA, A.; LIAUWA, C. M.; STRATTON, J.; MCINTYRE, R. B. Behaviour of nanoparticle (ultrafine) titanium dioxide pigments and stabilisers on the photooxidative stability of water based acrylic and isocyanate based acrylic coatings. **Polym Degrad Stab**, v. 78, p. 467-478, 2002.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2010.

ANTONIOU, C. ; KOSMADAKI, M. G. ; STRATIGOS, A. J. ; KATSAMBAS, A. D. Sunscreens – what’s important to know. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.22, n.9, p.1110-1118, 2008.

BEHADUR, N. M. ; FURUSAWA, T. ; SATO, M. ; KURAYAMA, F. ; SUZUKI, N. Rapid synthesis, characterization and optical properties of TiO₂ coated ZnO nanocomposite particles by a novel microwave irradiation method. **Mater Res Bull**, v. 45, p. 1383-1388, 2010.

BINNEMANS, K. Ionic liquid crystals. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 4148-4204, 2005.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Efeitos da radiação UV sobre a pele**, 2010. Disponível em: http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV_e_pele.html#Canceres. Acesso em: 24 fev. 2010_a

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 2.466, de 31 de Agosto de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília 06 set. 2010_b. Seção I, p. 42.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Radiação solar**, 2010. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=21. Acesso em: 24 fev. 2010_c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Proteção Solar**: sua pele merece esse cuidado, Brasília, 2007.(Cartilha Sobre Proteção Solar)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”, Brasília, 2003.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science - the physics and chemistry of sol-gel processing**. San Diego: Academic Press, 1990.

CALCABRINI, A. ; STRINGARO, A. ; TOCCACIELI, L. ; MESCHINI, S. ; MARRA M. ; COLONE, M. ; GIUSEPPE, S. ; MONDELLOW, F. ; ARANCIA, G. ; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, The Main Component of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. **J Invest Dermatol.**, v. 122, p. 349–360, 2004.

CHIBA, K.; KAWAKAMI; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, mtt and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol In Vitro**, v. 12, p. 251–258, 1998.

CHOI, Y. G.; LEE, J. H.; BAE, I. H.; AH, Y. C.; KI, H. M.; BAE, J. H.; PARK, Y. H.; LEE, K. C.; LIM, K. M. Titanium dioxide inclusion in backing reduce the photoallergenicity of ketoprofen transdermal patch. **Arch Toxicol**, v. 85, p. 219-226, 2011.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, p. 123-133, 2001.

DIFFEY, B. L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **J Soc Cosmet Chem**, v. 40, p. 127-133, 1989.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. **J Am Acad Dermatol.** v. 43, p. 1024-1035, 2000.

DONG, Y. D. ; BOYD, B. J. Applications of x-ray scattering in pharmaceutical science. **Int J Pharm**, v. 417, p. 101-111, 2011.

DUALE, N.; OLSEN, A. K.; CHRISTENSEN, T.; BUTT, S. T.; BRUNBORG, G. Octyl methoxycinnamate modulates gene expression and prevents cyclobutane pyrimidine dimer formation but not oxidative DNA damage in UV-exposed human cell lines. **Toxicol Sci**, v. 114, p. 272-284, 2010.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; MARTON, S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. **Int J Pharm**, v. 193, p. 239-245, 2000.

FAZIO, S.; GUZMAN, J.; COLOMER, M. T.; SALOMONI, A.; MORENO, R. Colloidal stability of nanosized titania aqueous suspensions. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 28, p. 2171-2176, 2008.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Quim. Nova**, v. 30, p. 153–158, 2007.

FUJITA, K.; HORIE, M.; KATO, H.; ENDOH, S.; SUZUKI, M.; NAKAMURA, A.; MIYAUCHI, A.; YAMAMOTO, K.; KINUGASA, S.; NISHIO, K.; YOSHIDA, Y.; IWAHASHI, H.; NAKANISHI, J. Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: Involvement of extracellular matrix and cell adhesion. **Toxicol Lett**, v. 191, p. 109–117, 2009.

GAISIN, N. K.; GNEZDILOV, O. I.; PASHIROVA, T. N.; ZHIL'TSOVA, E. P.; LUKASHENKO, S. S.; ZAKHAROVA, L. Y.; DZHABAROV, V. I.; GALYAMEDINOV, Y. G. Micellar and liquid crystalline properties of bicyclic fragment containing cationic surfactant. **Colloid J**, v. 72, p. 764–770, 2010.

GAROLI, D. ; PELIZZO, M. G. ; NICOLOSI, P. ; PESERICO, A. ; TONIN, E. ; ALAIBAC, M. Effectiveness of different substrate materials for in vitro sunscreen tests. **Int J Cosmet Sci**, v. 56, p. 89-98, 2009.

GREAY, S. J. ; IRELAND, D. J. ; KISSICK, H. T. ; HEENAN, P. J. ; CARSON, C. F. ; RILEY, T. V. ; BEILHARZ, M. W. Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 66, n. 6, p.1095-1102, 2010.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T. V.; NIELSEN, J. B. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p.616–625, 2006.

HEINRICH, U. ; TRONNIER, H. ; KOCKOTT, D. ; HEISE, H. M. Comparison of sun protection factors determined by an in vivo and different in vitro methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products. **Int J Cosmet Sci.**, v. 26, p. 79-89, 2004.

JACOBS, J. F.; POEL, I. V.; OSSEWEIJER, P. Sunscreens with titanium dioxide (TiO₂) nano-particles: a societal experiment. **Nanoethics**, v. 4, p. 103-113, 2010.

JAIN, S. K.; JAIN, N. K. Multiparticulate carriers for sun-screening agents. **Int J Cosmet Sci**, v. 32, p. 89-98, 2010.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J Nanopart Res**, v. 11, p. 77-89, 2009.

JIN, C, Y.; ZHU, B. S.; WANG, X. F.; LU, Q. H. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. **Chem Res Toxicol**, v. 21, p. 1871–1877, 2008.

KAMINSKI, R. C. K.; PULCINELLI, S. H.; JUDEINSTEIN, P.; MENEAU, F.; BRIOIS, V.; SANTILLI, C. V. Thermo-reversible sol-gel transition of surface modified titanium poly oxo building blocks. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, p. 1416-1423, 2010_a.

KAMINSKI, R. C. K.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V.; MENEAU, F.; BLANCHANDIN, S.; BRIOIS, V. Thermo-reversible sol-gel transition of TiO₂ nanoparticles with surface modified by p-toluene sulfonic acid. **J Eur Ceram Soc**, v. 30, p. 193–198, 2010_b.

KATTEN MUCHIN ROSENMAN LLP. **Patch for reducing exposure of skin to ultraviolet radiation**. US2007/0269496A1, 22 nov. 2007.

KIM, H. J. ; CHEN, F. ; WU, C. ; WANG, X. ; CHUNG, H. Y. ; JIN, Z. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. **J Agric Food Chem.**, v. 52, p. 2849-2854, 2004.

KISS, B.; BÍRÓ, T.; CZIFRA, G.; TÓTH, B.; KERTÉSZ, Z.; SZIKSZAI, Z. KISS, A. Z.; JUHÁSZL, I.; ZOUBOULIS, C. C.; HUNYADI, J. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. **Exp Dermatol**, v. 17, p. 659-667, 2008.

KLUG, H. L. P.; TOOZE, J. A.; CHERRY, C. G. ; ANVER, M. R.; NOONAN, F. P.; FEARS, T. R.; TUCKER, M. A.; FABO, E. C.; MERLINO, G. Sunscreen prevention of melanoma in man and mouse. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, p. 835-837, 2010.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on the 96-well plates. **Anal Biochem**, v. 182, p. 16–19, 1989.

LABSPHERE. **Manual UV-2000S ultraviolet transmittance analyser**. North Sutton, 2008. 38p.

LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; YOA, L.; GU, C.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Eur Food Res Technol.**, v. 229, p. 247-253, 2009.

MACCARI, F. L. R. **Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* da *melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol, permeação, retenção cutânea *in vitro* e estabilidade de emulsões contendo terpinen-4-ol**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

- MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, V.; JUODKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. **Toxicol In Vitro**, v. 18, p. 639–648, 2004.
- NIELSEN, J. B. ; NIELSEN, F. Topical use of tea tree oil reduces the dermal absorption of benzoic acid and methiocarb. **Arch Dermatol Res**, v. 297, p. 395–402, 2006.
- NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. PH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery. **Langmuir**, v. 27, p. 5296–5303, 2011.
- NORVAL, M.; WULF, H. C. Does chronic sunscreen use reduce vitamin D production to insufficient levels? **Br J Dermatol**, v. 161, p. 732-736, 2009.
- OTT, L. S.; FINKE, R. G. Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis: a critical review of ranking methods and putative stabilizers. **Coord Chem Rev**, v. 251, p. 1075-1100, 2007.
- OTTO, A.; PLESSIS, J. D.; WIECHERS, J. W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. **Int J Cosmet Sci**, v.31, p. 1–19, 2009.
- PATRAVALE, V. B.; MANDAWGADE, S. D. Novel cosmetic delivery systems : an application update. **Int J Cosmet Sci**, v. 30, p. 19–33, 2008.
- POPOV, A. P. ; PRIEZZHEV, A. V. ; LADEMANN, J. ; MYLLYLA, R. Monte Carlo calculations of UV protective properties of emulsions containing TiO₂, Si and SiO₂ nanoparticles. **Proc. SPIE**, v.7022, p.702211, 2008.
- REICHLING, J.; LANDVATTER, U.; WAGNER, H.; KOSTKA, K.; SCHAEFER, U. F. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 64, p. 222-228, 2006.
- SADRIEH, N.; WOKOVICH, A. M.; GOPEE, N. V.; ZHENG, J.; HAINES, D. H.; PARMITER, D.; SIITONEN, P.; COZART, C. R.; PATRI, A. K.; MCNEIL, S. E.; HOWARD, P. C.; DOUB, W. H.; BUHSE, L. Lack of significant dermal penetration of

titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. **Toxicol Sci**, v. 115, p. 156-166, 2010.

SÃO PAULO(Estado). Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. **Câncer de pele**, 2010. Disponível em: <http://www.icesp.org.br/Pacientes-e-Acompanhantes/Sobre-o-Câncer/Saiba-Mais/Câncer-de-Pele/>. Acesso: em 03 mar. 2010.

SAYES, C. M.; WAHI, R.; KURIAN, P. A.; LIU, Y.; WEST, J. L.; AUSMAN, K. D.; WARHEIT, D. B.; COLVIN, V. L. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicol Sci**, v. 92, p. 174–185, 2006.

SCALIA, S.; MEZENNA, M.; BIANCHI, A. Comparative evaluation of different substrates for the in vitro determination of sunscreen photostability: spectrophotometric and HPLC analyses. **Int J Cosmet Sci.**, v. 32, p. 55-64, 2010.

SEITE, S.; COLIGE, A.; VIVENOT, P. P.; MONTASTIER, C.; FOURTANIER, A.; LAPIÈRE, C.; NUSGENS B. A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 16, p. 147-155, 2000.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chim Acta**, v. 360, p. 794–802, 2007.

SHEU, M. T. ; LIN, C. W. ; HUANG, M. C. ; SHEN, C. H. ; HO, H. O. Correlation of in vivo and in vitro measurements of sun protection factor. **J Food Drug Anal**, v. 11, p. 128-132, 2003.

SPRINGSTEEN, A. ; YUREK, R. ; FRAZIER, M. ; CARR, K. F. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Anal Chim Acta**, v.380, p. 155-164, 1999.

- STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic chemistry**. New York: Wiley-Interscience, 1996.
- TIDDYG, J. T. **Surfactant-water liquid crystal phases**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1980.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. Topical and Transdermal Drug Products. **Pharmacopeial Forum**, v. 35, n. 3, p.750 – 764, May–June 2009.
- VASIL'EVA, K. L. ; ISHCENKO, O. M. ; ZAKHAROVA, N. V. ; MALKOV, A. A. ; MALYGIN, A. A. A study of phase transformations in the surface layer of titanium dioxide. **Russ J Appl Chem**, v. 5, p.783-788, 2009.
- VICENTINI, F. T. M. C. ; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A.; GEORGETTI, S. Quercetin in lyotropic liquid crystalline formulations: physical, chemical and functional stability. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 591–596, 2008.
- WANG, S. K.; BALAGULA, I.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatol Ther**, v. 23, p. 31-47, 2010.
- WANG, S. Q. ; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the era of nanotechnology. **Semin Cutan Med Surg**, v. 30, p. 210-213, 2011.
- WANG, Z.; ZHOU, W. Lamellar liquid crystals of brij 97 aqueous solutions containing different additives. **J Solution Chem**, v. 38, p. 659–668, 2009.
- WENDLANDT, W. W. ; HECHT, H. G. **Diffuse reflectance**. New York: Interscience Publishers, 1966. 298 p.
- ZHANG, L. W.; YU, W. W.; COLVIN, V. L.; RIVIERE, M. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 228, p. 200–211, 2008.