

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIANCA ALOISE MANEIRA CORRÊA

**PLANEJAMENTO RACIONAL, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DE NOVOS ATIVOS PARA
A FOTOPROTEÇÃO**

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro
2013

BIANCA ALOISE MANEIRA CORRÊA

**PLANEJAMENTO RACIONAL, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DE NOVOS ATIVOS PARA
A FOTOPROTEÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro

2013

Ficha Catalográfica

Corrêa, Bianca Aloise Maneira
Planejamento racional, desenvolvimento tecnológico e avaliação do potencial fotoprotetor de novos ativos para a fotoproteção --2013.
112 p.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

1. Proteção solar. 2. Filtros solares. 3. Derivados da benzofenona. 4. Octil-dimetil-PABA. 5. Dióxido de titânio 6. Montmorilonita. 7. Planejamento racional 8. Nanotecnologia. 9. DFT. 10. TD-DFT. I. Rodrigues, Carlos Rangel (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família amada, Claudia, Wilson, Vitor e Fábio. Agradeço por acreditarem em mim e nos meus sonhos, por todo apoio, incentivo, e também pela compreensão. Obrigada por sempre estarem presentes, mesmo com a distância.

Ao Carlos Eduardo, meu companheiro de toda a vida, pelo apoio, paciência e presença constante nessa jornada. Obrigada por me trazer sempre felicidade.

Aos professores Carlos Rangel Rodrigues e Lucio Mendes Cabral, por me aceitar como aluna e pela oportunidade, confiança e apoio. Obrigada por toda a atenção, tempo e esforço dedicados.

Aos meus tios, Kátia e Mauro, que me incentivaram e proporcionaram a oportunidade de estar aqui no Rio de Janeiro, e a minha tia amiga Shirley, sempre próxima e presente. Obrigada por todo apoio que me deram, não só nessa fase, mas também em todas da minha vida.

À todos os meus parentes, avós, tios e primos e às minhas amigas, que mesmo com a distância, continuaram participando da minha vida e estiveram sempre na torcida.

Aos alunos do Laboratório ModMolQSAR-3D e Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelo apoio.

Aos professores e colaboradores do programa de pós-graduação pelos ensinamentos e orientações e em especial à professora Magaly G. Albuquerque e ao Prof. Marcelo de Pádula.

Aos professores da banca por gentilmente aceitarem o convite e pelas contribuições.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Impossível é apenas uma palavra, usada por muita gente que prefere viver no mundo onde está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo. Impossível não é um fato, é uma opinião. Impossível não é uma declaração, é um desafio. Impossível é hipotético. O impossível é temporário.

O IMPOSSÍVEL É NADA.

(C.E.C.T.Santos)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Índice de figuras | 10 |
| Índice de tabelas | 13 |
| Índice de quadros..... | 14 |
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| 1. Introdução | 17 |
| 1.1. Pele..... | 17 |
| 1.2. Radiação solar | 19 |
| 1.2.1. Efeitos da radiação UV solar na pele | 20 |
| 1.3. Protetores solares | 27 |
| 1.3.1. Filtros solares | 28 |
| 1.4. Argilas de interesse farmacêutico | 37 |
| 1.4.1. Montmorilonita..... | 38 |
| 1.4.2. Complexos de inclusão formados por argila e filtros solares | 40 |
| 1.5. Nanotecnologia | 42 |
| 1.5.1. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção | 42 |
| 1.6. Avaliação do potencial fotoprotetor em levedura | 43 |
| 1.6.1. Estudos com TiO ₂ e MMT-Na..... | 44 |
| 1.7. Modelagem molecular..... | 46 |
| 1.7.1. Mecânica molecular..... | 46 |
| 1.7.2. Mecânica quântica..... | 48 |
| 1.7.3. Teoria do Funcional da Densidade (DFT) | 50 |
| 2. Justificativa..... | 52 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3. | Objetivos | 53 |
| 3.1. | Objetivo geral | 53 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 53 |
| 4. | Material e métodos..... | 54 |
| 4.1. | Material | 54 |
| 4.1.1. | Matérias-primas e reagentes..... | 54 |
| 4.1.2. | Equipamentos | 54 |
| 4.2. | Métodos | 55 |
| 4.2.1. | Estudo das propriedades estruturais, eletrônicas e de absorção UV de derivados da benzofenona | 55 |
| 4.2.2. | Preparação dos complexos de inclusão formados por MMT-Na e ODP | 59 |
| 4.2.3. | Preparação de nanosistemas formados por MMT-Na e TiO ₂ | 61 |
| 4.2.4. | Caracterização dos materiais formados | 61 |
| 4.2.5. | Avaliação do potencial fotoprotetor em leveduras..... | 63 |
| 5. | Resultados e discussão | 65 |
| 5.1. | Estudo das propriedades estruturais, eletrônicas e de absorção UV de derivados da benzofenona..... | 65 |
| 5.1.1. | Estudo das propriedades estruturais de derivados da benzofenona | 65 |
| 5.1.2. | Determinação da capacidade de predição do espectro de absorção UV de derivados da benzofenona | 70 |
| 5.1.3. | Estudo das relações estrutura-propriedade de absorção UV de derivados da benzofenona..... | 74 |
| 5.2. | Complexos de inclusão MMT-ODP | 80 |
| 5.2.1. | Desenvolvimento dos complexos de inclusão formados por MMT e ODP | 80 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.2.2. | Caracterização | 83 |
| 5.2.3. | Avaliação do potencial fotoprotetor dos complexos MMT- ODP | 91 |
| 5.3. | Nanosistemas MMT-TiO ₂ | 93 |
| 5.3.1. | Preparação de nanosistemas formados por MMT-Na e TiO ₂ 93 | |
| 5.3.2. | Caracterização | 93 |
| 5.3.3. | Avaliação do potencial fotoprotetor dos nanosistemas MMT- TiO ₂ | 98 |
| 6. | Conclusão | 101 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 102 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotomicrografia de secção de pele (aumento de 480X). (Disponível em: www.pucrs.campus2.br/~maricar/citohisto_II/siste_teg.ppt . Acesso em: 08 fev 2012). | 17 |
| Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de pele não melanoma por 100 mil homens (esquerda) e mulheres (direita) estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2011). | 26 |
| Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno de pele por 100 mil homens (esquerda) e mulheres (direita) estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2011). | 26 |
| Figura 4. Representação esquemática dos tipos de transições eletrônicas (CORRÊA, 2010). | 30 |
| Figura 5. Estrutura química da benzofenona (BF). | 31 |
| Figura 6. Estrutura química da benzofenona-3 (BF-3). | 32 |
| Figura 7. Estrutura química do DHHB. | 32 |
| Figura 8. Estrutura química do octil dimetil PABA (ODP). | 34 |
| Figura 9. Estrutura da montmorilonita sódica (PAUL & ROBESON, 2008). | 40 |
| Figura 10. Sobrevivência da cepa CD138 (<i>ogg1</i>) de <i>S.cerevisae</i> após exposição UVB, pré-tratadas ou não com TiO ₂ , MMT-Na ou a mistura física (MF) de TiO ₂ e MMT-Na. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos (Resultados cedidos por PAIVA e col., 2013). | 45 |
| Figura 11. Mutagênese da cepa CD138 (<i>ogg1</i>) de <i>S.cerevisae</i> após exposição UVB, pré-tratadas ou não com TiO ₂ , MMT-Na ou a mistura física (MF) de TiO ₂ e MMT-Na. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos (Resultados cedidos por PAIVA e col., ainda não publicados). . | 45 |
| Figura 12. Diferença percentual de valor entre a geometria calculada (DFT/B3LYP) e a estrutura cristal (dados de cristalografia da raios-X; código CSD: HMXBZP (LIEBICH & PARTHE, 1974)). | 67 |
| Figura 13. Comparação do espectro de absorção UV teórico (método TD-DFT/B3LYP/6-31G(d) no vácuo) e experimental (diclorometano). A | |

| | |
|--|----|
| normalização da absorbância foi realizada de acordo com a intensidade máxima de cada espectro. | 70 |
| Figura 14. Comparação dos comprimentos de onda (nm) de absorção máxima teórica e experimental. | 73 |
| Figura 15. Espécies majoritárias do filtro solar ODP. | 81 |
| Figura 16. Curva padrão de ODP em etanol. | 82 |
| Figura 17. Padrões de difração do complexo MMT-ODP e da MMT-Na pura. . | 84 |
| Figura 18. Espectro de IV-TF da MMT-Na. | 85 |
| Figura 19. Espectros de IV-TF da MMT-Na pura, ODP puro e do complexo MMT:ODP. | 87 |
| Figura 20. Curvas de DSC e TGA da MMT-Na pura (linhas pontilhadas) e do produto da reação de intercalação MMT:ODP (linhas sólidas). | 89 |
| Figura 21. Distribuição de tamanho de particular da MMT-Na e do complexo MMT-ODP. | 90 |
| Figura 22. Sobrevivência da cepa CD138 (<i>ogg1</i>) após tratamento com UVB, pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e ODP ou com o complexo MMT-ODP. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos. | 92 |
| Figura 23. Mutagênese da cepa CD138 (<i>ogg1</i>) após tratamento com UVB de 10 kJ/m ² (DL ₁₀), pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e ODP ou com o complexo MMT-ODP. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos. | 92 |
| Figura 24. Padrões de difração da MMT-Na pura e sonicada, mistura física de MMT-Na e TiO ₂ , do produto da reação de intercalação MMT-TiO ₂ e do dióxido de titânio puro em intervalo de 2θ entre 2 e 20 graus. | 94 |
| Figura 25. Padrões de difração da mistura física de MMT-Na e TiO ₂ e do produto da reação de intercalação MMT-TiO ₂ em intervalo de 2θ entre 20 e 60 graus. | 95 |
| Figura 26. Curvas de DSC e TGA da mistura física de MMT-Na e TiO ₂ (cinza) e do produto da reação de intercalação MMT-TiO ₂ (preto). | 97 |
| Figura 27. Distribuição de tamanho de partículas do TiO ₂ e MMT-Na puros e do nanosistema de MMT-TiO ₂ | 98 |

Figura 28. Sobrevivência da cepa CD138 (*ogg1*) após tratamento com UVB, pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e TiO₂ ou com o nanosistema MMT-TiO₂. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos..... 99

Figura 29. Mutagênese da cepa CD138 (*ogg1*) após tratamento com UVB de 10 kJ/m² (DL₁₀), pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e TiO₂ ou com o nanosistema MMT-TiO₂. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos. 100

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número de onda, comprimento de onda e quantidade da radiação UV solar que atinge a terra (GALLAGHER & LEE, 2006; YOUNG, 2006; BRASIL, 2010). | 20 |
| Tabela 2. Características típicas de alguns cromóforos (PAULA, 2003). | 30 |
| Tabela 3. Série de derivados da BF utilizada no estudo. | 56 |
| Tabela 4. Lista de códigos e respectivas referências das estruturas disponíveis no banco de dados CSD. | 58 |
| Tabela 5. Parâmetros calculados usando diferentes métodos e dados experimentais (dados de cristalografia de raios-X; código CSD: HMXBZP (LIEBICH & PARTHE, 1974)) ^a | 66 |
| Tabela 6. Parâmetros estruturais das benzofenonas calculadas por DFT/B3LYP/6-31G(d) e os dados experimentais (cristalografia de raios-X). ... | 69 |
| Tabela 7. Transições (comprimento de onda – nm e energia - eV), força de oscilação (f) ($f > 0.1$) e composição em termos de orbitais moleculares (MO) calculadas para as benzofenonas. | 72 |
| Tabela 8. Rendimento e massa de ODP no complexo formado pelas reações. | 83 |

ÍNDICE DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Alterações cutâneas provocadas por envelhecimento intrínseco e extrínseco (MONTAGNER & COSTA, 2009)..... | 23 |
| Quadro 2. Orbitais de HOMO e LUMO das hidroxibenzofenonas. | 74 |
| Quadro 3. Orbitais HOMO e LUMO das metoxi e etoxibenzofenonas. | 77 |
| Quadro 4. Orbitais HOMO e LUMO das aminobenzofenonas..... | 79 |

RESUMO

Os filtros solares em estudo neste trabalho apresentam algumas características não desejadas para a fotoproteção, como a atividade estrogênica evidenciada em estudos com a benzofenona-3 (BF-3), as irritações cutâneas e reações fotoalérgicas do octil-dimetil-PABA (ODP) e a geração de radicais livres induzida pelo dióxido de titânio (TiO_2) quando irradiado por raios UV. Tendo em vista a ampla utilização desses filtros solares e a importância do uso de protetores solares como estratégia para a prevenção de danos causados pela radiação, inclusive o câncer de pele, julga-se necessário contribuir com o desenvolvimento de ativos fotoprotetores mais seguros e eficazes. O presente trabalho tem como objetivo fundamentar propostas de modificação estrutural para o planejamento de novos fotoprotetores mais eficientes e seguros, estudando por métodos teóricos o perfil de absorção UVA/UVB de uma série de derivados de benzofenonas (BFs); preparar e caracterizar complexos de inclusão e nanosistemas formados por filtros solares, octil-dimetil-PABA (ODP) e dióxido de titânio (TiO_2), intercalados em montmorilonita sódica (MMT-Na); e investigar as mudanças de propriedades dos compostos de intercalação, avaliando o potencial fotoprotetor e genotóxico em modelo de levedura (*S. cerevisiae*). As propriedades estruturais, eletrônicas e espectrais de derivados de benzofenona (BF) foram estudadas pela teoria do funcional da densidade (DFT) e a teoria do funcional da densidade dependente do tempo (TD-DFT). O método DFT/B3LYP com a base 6-31G(d) se mostrou um método acurado para a otimização geométrica de BFs. As absorções máximas obtidas pelos cálculos TD-DFT no vácuo estão de acordo com as bandas de absorção experimentais. Os resultados indicam que as transições eletrônicas principais na região do UVA/UVB são características de transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os orbitais de fronteira HOMO \rightarrow LUMO. A força de oscilação parece aumentar na presença da dissubstituição na posição *para*. A posição de substituintes próticos parece estar relacionada com o pico de absorção, a absorção na faixa do UVB ocorre na presença da substituição na posição *para*, enquanto a substituição em *orto* leva a uma absorção na região do UVA. Os resultados obtidos fornecem características importantes de BFs que podem ser úteis para o desenho racional de novos ativos fotoprotetores com propriedades desejadas de absorção UV (comprimentos de onda e intensidade). Na segunda etapa deste trabalho, realizou-se o preparo e caracterização de novos ativos fotoprotetores obtidos pelo processo de intercalação de filtros solares em montmorilonita sódica. Os complexos de inclusão formados por octil-dimetil-PABA (ODP) e montmorilonita (MMT) podem contribuir com a toxicidade celular em altas doses de UVB. Contudo, em baixas doses de UVB, são capazes de proteger as células contra os efeitos mutagênicos dessa radiação, sem contribuir com os efeitos tóxicos. Os nanosistemas formados por dióxido de titânio (TiO_2) e montmorilonita se mostraram ativos fotoprotetores promissores. O TiO_2 se mostra capaz de esfoliar a argila sem alterar a sua estrutura. Nos ensaios da avaliação do potencial fotoprotetor em leveduras, a presença do nanosistema MMT- TiO_2 , reduziu drasticamente a mutagênese, superando a proteção contra os efeitos mutagênicos da radiação UVB observada nas leveduras tratadas com a mistura física MMT + TiO_2 .

ABSTRACT

Sunscreens studied in this work have some undesirable characteristics for the photoprotection as estrogenic activity observed in studies with benzophenone-3 (BF-3), photoallergic skin irritations and reactions of the octyl-dimethyl-PABA (ODP) and generation of free radicals induced by titanium dioxide (TiO₂) when irradiated by UV rays. Given the widespread use of sunscreens and the importance of using sunscreens as a strategy for prevention of radiation damage, including skin cancer, it is deemed necessary to contribute to the development of active sunscreen safer and more effective. This work aims to support proposed changes to the structural design of new sunscreens more effective and safe methods for studying the theoretical absorption profile UVA / UVB of a series of derivatives of benzophenones (BFs) prepare and characterize inclusion complexes and nanocomposites consisting of sunscreens, octyl-dimethyl-PABA (ODP) and titanium dioxide (TiO₂), interspersed montmorillonite (MMT-Na), and investigate the changes of properties of the intercalation compounds, and assessing the photoprotective potential genotoxic model in yeast (*S. cerevisiae*). The structural, electronic, and spectral properties of benzophenone (BZP) derivatives have been studied by density functional theory (DFT) and time-dependent DFT (TD-DFT) methods. DFT/B3LYP with the 6-31G(d) basis set is an accurate method for optimizing the geometry of BZPs. The absorption maxima obtained from the TD-DFT calculations in a vacuum were in agreement with the experimental absorption bands and showed that the main electronic transitions in the UVA/UVB range present $\pi \rightarrow \pi^*$ character, the major transition being HOMO \rightarrow LUMO. The oscillator strength seems to increase in the presence of disubstitution at the para position. For protic substituents, the position appears to be related to the absorption band. Absorption in the UVB range occurs in the presence of para substitution, whereas ortho substitution leads to absorption in the UVA spectral region. The obtained results provide some features for BZP derivatives that can be useful for customizing absorption properties (wavelengths and intensities) and designing new BZP derivatives as sunscreens. In the second phase of this study, there was the preparation and characterization of novel active photoprotective process obtained by intercalation of montmorillonite in sunscreens. Inclusion complexes formed by octyl-dimethyl-PABA (ODP) and montmorillonite (MMT) can contribute to cellular toxicity at high doses of UVB. However, at lower doses of UVB, are capable of protecting cells against the mutagenic effects of this radiation, without contributing toxic effects. The nanocomposites formed by titanium dioxide (TiO₂) and montmorillonite active sunscreens proved promising. The TiO₂ shows itself able to exfoliate the clay without changing its structure. In trials evaluating the photoprotective potential in yeast, the presence of TiO₂-MMT nanocomposite dramatically reduced mutagenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PELE

A pele, maior órgão do corpo humano, é uma interface biológica com o meio ambiente, altamente metabólica, que funciona como proteção física e bioquímica, via muitos mecanismos de defesa. Constitui uma barreira eficaz que impede a invasão por patógenos, agressões químicas e físicas, além de evitar a perda excessiva de água e solutos (RIBEIRO, 2006; MAMBRO & FONSECA, 2007; PROKSCH & BRANDNER & JENSEN, 2008).

A pele é constituída por duas camadas principais, epiderme e derme (Figura 1), e abaixo da derme há uma camada constituída por tecido adiposo, considerada como subcutânea, a hipoderme (RIBEIRO, 2006).

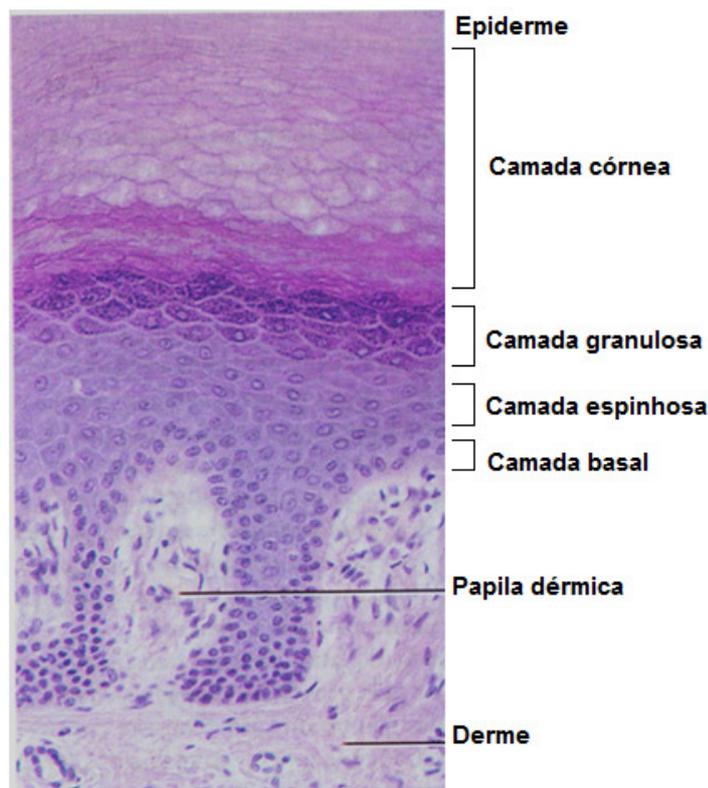


Figura 1. Fotomicrografia de secção de pele (aumento de 480X). (Disponível em: www.pucrs.campus2.br/~maricar/citohisto_II/siste_teg.ppt. Acesso em: 08 fev 2012).

A epiderme, a camada mais superficial que protege a pele contra as agressões do meio ambiente, é constituída por quatro camadas (Figura 1), onde as células ricas em queratina, os queratinócitos, passam por processo de divisão, diferenciação e morte, completando um ciclo celular de aproximadamente 28 dias (RIBEIRO, 2006; NEVES, 2008).

A origem da divisão celular (mitose) ocorre na camada basal, ou estrato germinativo, e as células sofrem diferenciação até completa queratinização (PROKSCH & BRANDNER & JENSEN, 2008). Na camada basal também estão localizados os melanócitos, células produtoras de melanina responsáveis pela pigmentação visível da pele, cabelos e olhos. A distribuição da melanina nos tecidos cutâneos afeta a cor e determina a fotoproteção natural da pele, pois a melanina é o pigmento responsável pela proteção da pele contra os raios ultravioletas (UV) (HEARING, 2011).

Acima da camada basal encontra-se a camada espinhosa, formada por queratinócitos de aspecto espinhoso com abundância de tonofibrilas, filamentos intermediários de citoqueratina que, na medida em que as células se diferenciam, formam grânulos de querato-hialina (RIBEIRO, 2006).

Os queratinócitos da camada granulosa, camada seguinte à espinhosa, são ricos em querato-hialina. Essa camada é responsável pela formação da bicamada lipídica presente entre as células da camada córnea, a camada mais externa da epiderme (RIBEIRO, 2006).

A camada ou estrato córneo possui de 15 a 20 μm (HADGRAFT, 2001). É constituída por corneócitos, células achatadas e anucleadas, ricas em proteínas, formadas nas etapas finais do processo de diferenciação dos queratinócitos. Os corneócitos são ricos em filamentos de queratina e envoltos por um envelope composto por proteínas reticulares e lipídeos que ficam dispostos em uma matriz lamelar, altamente hidrofóbica (bicamada lipídica), e são conectados por desmossomos. Essa estrutura funciona como a principal barreira contra agentes externos (PROKSCH & BRANDNER & JENSEN, 2008). A matriz lamelar possui função importante na formação da barreira cutânea (RIBEIRO, 2006).

A derme (Figura 1) fornece suporte mecânico, isto é, sustentação para a epiderme (WLASCHEK *et al.*, 2001), proporcionando resistência física frente às agressões mecânicas, além de fornecer os nutrientes à epiderme. A derme abriga os apêndices cutâneos como glândulas sudoríparas, sebáceas e folículo piloso, além de vasos sanguíneos e linfáticos, células conjuntivas e sanguíneas. É constituída por fibras proteicas, colágeno e elastina, associada a uma matriz extracelular. Os fibroblastos são os responsáveis pela produção dos componentes da derme (HOUK & GUY, 1988; RIBEIRO, 2006; NEVES, 2008).

1.2. RADIAÇÃO SOLAR

A energia do sol é emitida na forma de ondas eletromagnéticas de diferentes comprimentos. O espectro da radiação visível compreende a faixa de 400 a 800 nm (YOUNG, 2006) e corresponde a 44% da energia emitida pelo sol. Essa radiação causa poucos efeitos sobre a pele (RIBEIRO, 2006; NEVES, 2008).

A radiação no infravermelho (IV), que compreende a faixa de 800 nm a 1mm (YOUNG, 2006), corresponde a 48% da energia solar, e é capaz de penetrar profundamente na pele, podendo provocar a dilatação dos vasos sanguíneos. A radiação no IV, em combinação com a radiação ultravioleta (UV), contribui com o fotoenvelhecimento cutâneo. Por penetrar profundamente na pele, a radiação no IV deixa grande quantidade de energia na derme que agride os tecidos. Entretanto, o calor fornecido estimula a circulação do sangue e o metabolismo geral (RIBEIRO, 2006; NEVES, 2008).

Apenas 7% do espectro solar representa a radiação no UV, que possui o maior nível de energia e os menores comprimentos de onda, de 100 a 400 nm (GALLAGHER & LEE, 2006; RIBEIRO, 2006; NEVES, 2008).

A radiação no UV pode ser subdividida em três faixas: UVA, UVB e UVC (RIBEIRO, 2006; YOUNG, 2006; NEVES, 2008). Na Tabela 1 estão reunidas algumas informações pertinentes a essas radiações (GALLAGHER & LEE, 2006; YOUNG, 2006; BRASIL, 2010).

Tabela 1. Número de onda, comprimento de onda e quantidade da radiação UV solar que atinge a terra (GALLAGHER & LEE, 2006; YOUNG, 2006; BRASIL, 2010).

| Radiação | Número de onda (cm ⁻¹) | Comprimento de onda (nm) | % de radiação UV terrestre |
|------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| UVA | 31250 - 25000 | 320 – 400 | ~ 95 |
| UVB | 35714 - 31250 | 280 – 320 | ~ 5 |
| UVC | 100000 - 35714 | 100 – 280 | ~ 0 |

1.2.1. Efeitos da radiação UV solar na pele

A exposição da pele humana à radiação UV induz múltiplas lesões na derme e epiderme, resultando em vários danos que incluem o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (JEAN *et al.*, 2011).

A radiação UVA (320 a 400 nm), que constitui ~ 95% do espectro UV solar, é uma radiação de menor energia, porém, penetra mais profundamente na pele. Devido ao elevado comprimento de onda, quando comparada às outras faixas, provoca vários danos na derme. É uma radiação pouco absorvida pelo DNA, mas, indiretamente, possui ação genotóxica, pois promove a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres que causam danos ao DNA, via processos oxidativos. Tem participação importante em fotoalergias e potencializa a ação da radiação UVB, induzindo a formação de câncer de pele (LENAERS *et al.*, 2007; MAMBRO & FONSECA, 2007; NEVES, 2008; JEAN *et al.*, 2011).

A radiação UVB (290 a 320 nm) apresenta efeitos predominantes na epiderme, sendo responsável pelas reações agudas na pele, como eritema (vermelhidão) e queimadura solar. Em longo prazo, pode provocar danos graves, como câncer de pele (NEVES, 2008; JEAN *et al.*, 2011). Foi a primeira radiação identificada com a capacidade de induzir danos ao DNA, porque seu espectro de emissão equivale ao espectro de absorção do DNA. Esta faixa de comprimento de onda é diretamente absorvida pelo DNA, induzindo reações fotoquímicas de degradação, envolvendo as bases nitrogenadas (purinas ou

pirimidinas), com conseqüente formação de fotoprodutos, como os dímeros de pirimidina do tipo ciclobutano (do inglês *cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD), e lesão do DNA (LENAERS *et al.*, 2007; JEAN *et al.*, 2011).

A radiação UVC (200-290 nm) é absorvida pela camada de ozônio e não atinge a superfície da terra (NEVES, 2008).

1.2.1.1. Fotoenvelhecimento

Dois processos, intrínseco e extrínseco, contribuem com todas as alterações que resultam no envelhecimento cutâneo. O primeiro (cronológico) é proveniente da degeneração lenta, mas parcialmente reversível dos tecidos conectivos. O segundo é proveniente de fatores extrínsecos, principalmente por danos da radiação UV, sendo denominado de fotoenvelhecimento, que acelera o envelhecimento da pele e promove alterações características de uma pele fotoenvelhecida (WLASCHEK *et al.*, 2001).

O fotoenvelhecimento é um processo biológico complexo causado pela exposição crônica à radiação UV. Inclui várias alterações bioquímicas e fisiológicas na pele, que podem ser observadas principalmente no tecido conectivo da derme (WLASCHEK *et al.*, 2001). Essas alterações compreendem o estresse oxidativo, com mutações no DNA, lipoperoxidação, fotoxidação de proteínas, desequilíbrio na produção de enzimas antioxidantes e a indução de metaloproteases de matriz (WLASCHEK *et al.*, 2001; SVOBODOVA & WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006; NEVES, 2008).

Como resposta ao fotoenvelhecimento, ocorre indução ou aceleração de mudanças no aspecto da pele, como manchas, descamações, aspereza e ressecamento, rugas profundas, flacidez devido às alterações nas fibras elásticas e talangiectasia (dilatação anormal dos vasos sanguíneos) (WLASCHEK *et al.*, 2001; SVOBODOVA & WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006; NEVES, 2008).

Na pele danificada pela radiação UV, o colágeno, maior componente estrutural da derme, está diminuído e desorganizado. Os vasos sanguíneos estão dilatados e sinuosos, o número de células inflamatórias está aumentado,

os melanócitos estão anormais e em menor número e os queratinócitos estão irregulares, com menor polaridade. Ocorrem também mudanças na elastina encontrada na derme fotoenvelhecida (WATANABE *et al.*, 2004; SVOBODOVA & WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006; MONTAGNER & COSTA, 2009).

O Quadro 1 reúne as alterações provocadas pelo envelhecimento intrínseco e extrínseco da pele (MONTAGNER & COSTA, 2009).

A radiação UVA, por penetrar mais profundamente na pele e atingir a derme, tem um papel fundamental no fotoenvelhecimento. Estudos demonstram que a pele humana, exposta diariamente durante 1 mês, à radiação UVA, sem causar eritema, apresenta hiperplasia da epiderme e afinamento da derme, além da depleção das células de Langerhans (defesa) e infiltrados inflamatórios na derme com deposição de lisossomas nas fibras elásticas. Essas alterações sugerem que mesmo uma exposição casual ao sol, fazendo o uso de um filtro solar UVB, pode, eventualmente, resultar em danos no colágeno e na elastina, produzindo o fotoenvelhecimento (SVOBODOVA & WALTEROVA & VOSTALOVA, 2006).

Quadro 1. Alterações cutâneas provocadas por envelhecimento intrínseco e extrínseco (MONTAGNER & COSTA, 2009).

| | Envelhecimento intrínseco | Envelhecimento extrínseco |
|---|--|---|
| Rugas | Finas | Profundas |
| Camada córnea | Inalterada | Afilada |
| Células displásicas | Poucas | Muitas |
| Fibras de colágeno | Pequena alteração no tamanho e organização | Grande alteração no tamanho e organização |
| Fibras elásticas | Reorganizadas | ↓ produção ↑ degeneração |
| Folículo capilar | ↓ número e afinamento | ↓ número e estrutura: perda capilar |
| Melanócitos | Normal | ↓ número e anormais |
| Glândulas sebáceas e sudoríparas | ↓ número | ↓ número: pele seca |
| Junção dermoepidérmica | Leve achatamento | Importante achatamento |
| Microvasculatura | Área reduzida | Telangiectasias, equimoses, infiltrado inflamatório perivascular. |
| Alterações benignas | Ceratose seborreica | Ceratose seborreica |
| Alterações pré-malignas | - | Ceratose actínica |
| Alterações malignas | - | Carcinoma basocelular Carcinoma espinocelular |

↓: redução; ↑: aumento

1.2.1.2. Câncer de pele

A pele é o órgão mais acessível à agressão de agentes ambientais, como a radiação UV, pois recobre a grande superfície corpórea estando constantemente exposta a uma variedade de agentes externos.

O processo da carcinogênese é desenvolvido em três estágios, iniciação, promoção e progressão tumoral, mediados por várias alterações celulares, bioquímicas e moleculares, que podem ter o envolvimento de EROs (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A iniciação é o primeiro estágio e envolve a indução de alterações estruturais no DNA, isto é, alterações genéticas, originando as mutações. A radiação UV pode causar danos ao DNA por alteração direta causada pela sua absorção, ou pela formação de EROs, via processos oxidativos. O segundo estágio da carcinogênese, a promoção tumoral, é a etapa mais lenta, onde ocorre uma seletiva hiperplasia, que conduz à expansão clonal das células iniciadas. A progressão, terceiro e último estágio se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Existem dois grupos distintos de câncer de pele: não melanoma, mais frequente e menos agressivo, e melanoma, mais agressivo, porém muito raro (INCA, 2011). As diferentes linhagens de câncer de pele recebem denominações específicas, de acordo com as células das quais são originários.

O câncer não melanoma é uma neoplasia de bom prognóstico, com alta taxa de cura quando identificado precocemente e tratado de forma adequada e oportuna. Pode ser de dois tipos: carcinoma basocelular e espinocelular ou epidermóide (INCA, 2011).

O carcinoma basocelular é originado na camada basal da epiderme e é o câncer de pele mais comum, responsável por 70% dos diagnósticos. Apesar de mais incidente, é também o menos agressivo e de evolução lenta. O carcinoma basocelular é diagnosticado por uma lesão (ferida ou nódulo) e sua

severidade se manifesta dependendo do tipo histológico e da localização do tumor. Pode se manifestar sob a forma de pápula, com superfície perlácea ou ferida, que não cicatriza (INCA, 2011).

O carcinoma espinocelular é o segundo tipo mais comum e representa 25% dos casos. É proveniente das camadas mais superficiais da epiderme e pode se apresentar como placa endurecida, uma área descamativa ou com crostas e feridas, podendo surgir sobre áreas antigas de cicatrizes de queimaduras (NEVES, 2008). Evolui rapidamente e vem acompanhado de secreção e coceira. A maior gravidade do carcinoma epidermóide se deve à possibilidade de ocorrer metástase (espalhar-se para outros tecidos ou órgãos) (INCA, 2011).

O melanoma é o menos frequente de todos os cânceres de pele e representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão. No entanto, sua letalidade é a mais elevada, além de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Indivíduos de pele clara são os mais propensos a esse tipo de câncer, bem como aqueles que tiveram episódios de queimadura solar com bolhas quando crianças ou histórico familiar de melanoma. Esse tipo de câncer tem origem nos melanócitos e, por isso, pode ser encontrado em qualquer área que tenha pigmento, além de ter uma base genética. A neoplasia invade a epiderme, podendo atingir ou não a derme papilar superior. Pode se apresentar como uma lesão enegrecida, de bordos mal delimitados, com cores e diâmetros que se alteram com o tempo (NEVES, 2008; INCA, 2011).

A exposição excessiva ao sol é o principal fator de risco para o surgimento dos cânceres da pele não melanoma. Para o melanoma, em geral, um maior risco inclui história pessoal ou familiar de melanoma. Outros fatores de risco para todos os tipos de câncer de pele incluem sensibilidade da pele ao sol, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional (INCA, 2011).

No Brasil, em todas as regiões, o câncer de pele não melanoma continua sendo o tipo mais incidente no sexo feminino, com um risco estimado de 109 por 100 mil na região Centro-Oeste, 91 a 100 mil na região Sudeste, 68 por 100 mil na região Sul, 43 por 100 mil na região Norte e 42 por 100 mil na região Nordeste (Figura 2). Nos homens, é o mais incidente nas regiões

Centro-Oeste (124 por 100 mil), Sul (80 por 100 mil) e Norte (38 por 100 mil), enquanto, nas regiões Sudeste (73 por 100 mil) e Nordeste (39 por 100 mil), é o segundo mais frequente, com menor incidência apenas que o câncer de próstata. A estimativa para o ano de 2012 é de 62.680 casos novos de câncer da pele não melanoma entre homens e 71.490 em mulheres (INCA, 2011).

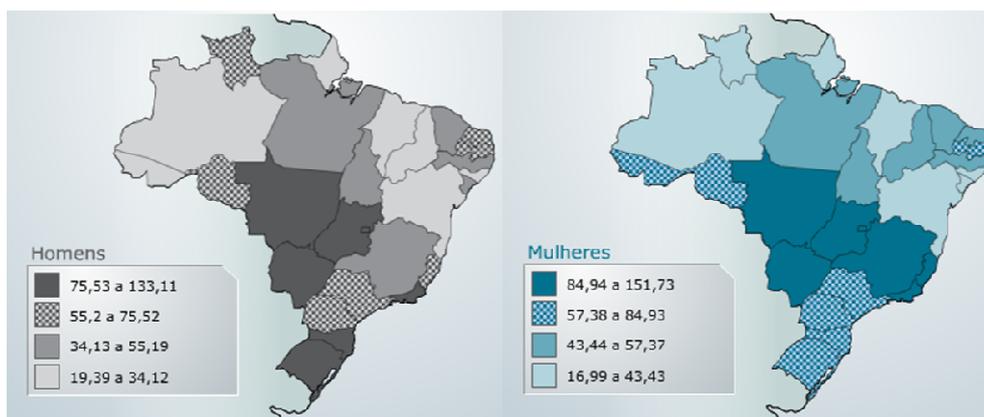


Figura 2. Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de pele não melanoma por 100 mil homens (esquerda) e mulheres (direita) estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2011).

Estima-se uma incidência baixa do melanoma de pele no ano de 2012 (Figura 3), com 3.170 casos novos em homens e 3.060 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (INCA, 2011).

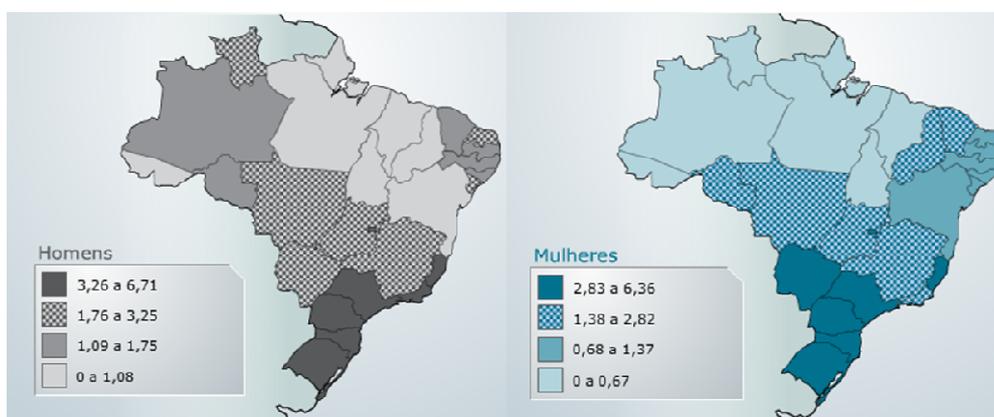


Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno de pele por 100 mil homens (esquerda) e mulheres (direita) estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (INCA, 2011).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), ações de prevenção primária que estimulem a proteção contra a luz solar são efetivas e de baixo custo para evitar o câncer de pele, inclusive os melanomas (INCA, 2011). Por isso, o uso de protetores solares é uma estratégia importante para a prevenção de danos à pele, incluindo o câncer de pele, sendo muito relevante a proteção UV em amplo espectro (ANSELMINI *et al.*, 2002; MOLONEY & COLLINS & MURPHY, 2002; RIBEIRO, 2006; VELASCO *et al.*, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda o uso de protetor solar com FPS (fator de proteção solar) de no mínimo 15 para a prevenção de câncer de pele e envelhecimento precoce (BRASIL, 2004).

1.3. PROTETORES SOLARES

Os protetores solares são formulações cosméticas de uso externo que contêm filtros solares, substâncias químicas e/ou físicas que atuam como barreiras protetoras da pele contra as radiações solares (BRASIL, 2004).

Os primeiros protetores solares desenvolvidos apresentavam eficácia fotoprotetora contra a radiação UVB e com pouco ou nenhum efeito fotoprotetor contra a radiação UVA. Inicialmente, acreditava-se que a radiação UVB, por ser uma radiação de alta energia e absorvida diretamente pelo DNA, era o principal agente causador de todos os cânceres de pele e, por isso, o FPS presente no rótulo de protetores solares refere-se à proteção contra a radiação UVB (PLANTA, 2011).

Com o conhecimento dos efeitos danosos da radiação UVA, inclusive no desenvolvimento de câncer de pele, as formulações fotoprotetoras atuais apresentam proteção também contra esse tipo de radiação. Um protetor solar eficiente deve apresentar proteção em amplo espectro, isto é, proteger a pele contra as radiações UVA e UVB (BRASIL, 2010).

Os protetores solares quando aplicados na pele devem formar um filme homogêneo que fique aderido na mesma com grande afinidade pelo estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001). A substantividade é a capacidade do protetor solar se manter na pele mesmo que em condições de estresse, como a

exposição ao suor e à água (COELHO *et al.*, 2008). Essa capacidade é determinada pela retenção da preparação no estrato córneo e está intimamente relacionada com a eficácia e segurança do protetor solar. Os riscos tóxicos provenientes da penetração dos filtros na pele são reduzidos, pois a exposição sistêmica à substância é evitada (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001) e a eficácia do produto é favorecida, devido a maior concentração e tempo de permanência dos filtros na superfície da pele (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; ANSELMINI *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2008).

1.3.1. Filtros solares

Os filtros solares possuem a capacidade de absorver, dispersar ou refletir os raios UVB e UVA, protegendo a pele contra os riscos associados à exposição cumulativa ou excessiva ao sol (LOWE, 2006; FORESTIER, 2008).

Os filtros UV são classificados em orgânicos e inorgânicos dependendo da sua natureza química. Os filtros orgânicos são formados por moléculas orgânicas que protegem a pele pela absorção da radiação UV. Os filtros solares inorgânicos, como os óxidos metálicos atuam refletindo e dispersando da radiação UV. Atualmente, existem os filtros orgânicos que apresentam a capacidade de reflexão e dispersão da radiação, além da sua capacidade de absorção, comportando-se como um filtro também de efeito físico (FLOR & DAVOLOS & CORRÊA, 2007).

1.3.1.1. Filtros solares orgânicos

Os filtros solares orgânicos protegem a pele porque absorvem a radiação UV, transformando-a em uma energia menos agressiva à pele. Para entender esse mecanismo, é importante o estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos filtros (CORRÊA, 2010; PAULA, 2003).

Determinados comprimentos de onda, na faixa da radiação UV-Vis, correspondem a energias capazes de promover a excitação eletrônica, isto é, a

transição eletrônica de um estado de menor energia para outro nível de energia (FLOR & DAVOLOS & CORRÊA, 2007; CORRÊA, 2010).

A excitação eletrônica ocorre devido à absorção de fótons com energia suficiente para transferir elétrons situados no orbital HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia, do inglês, *highest occupied molecular orbital*) para o orbital LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia, do inglês, *lowest unoccupied molecular orbital*) (FLOR & DAVOLOS & CORRÊA, 2007; CORRÊA, 2010).

Ao retornar ao estado inicial, o excesso de energia é liberado. As transições eletrônicas que estão envolvidas no processo de absorção da luz UV envolvem a diferença de energia entre HOMO e LUMO. Observa-se que como o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia, a diminuição na diferença de energia HOMO-LUMO leva a um aumento no comprimento de onda de absorção (FLOR & DAVOLOS & CORRÊA, 2007; CORRÊA, 2010).

Geralmente, quando a excitação ocorre, o elétron é promovido de HOMO para LUMO, embora as transições possam ocorrer a partir de orbitais de menor energia, como HOMO-1 ou HOMO-2, para orbitais de maior energia, como LUMO+1 (CORRÊA, 2010).

As transições eletrônicas que ocorrem durante o processo de absorção de luz são de diferentes naturezas e determinadas pela estrutura molecular responsável pela absorção dessa energia em uma determinada faixa da radiação, denominada de cromóforo. Qualquer alteração na estrutura do cromóforo pode influenciar, significativamente, no comprimento de onda absorvido (FORESTIER, 2008).

A Tabela 2 apresenta as transições observadas em determinados cromóforos e a Figura 4 é uma representação esquemática dos tipos de transições eletrônicas existentes.

Tabela 2. Características típicas de alguns cromóforos (PAULA, 2003).

| Transições | Comprimento de onda (nm) | $\epsilon_{\text{máx}}$ ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) | Cromóforo |
|-------------------------------|--------------------------|--|----------------------|
| $\sigma \rightarrow \sigma^*$ | <180 | 1000 | C-C e C-H |
| $n \rightarrow \sigma^*$ | <250 | - | C-O-H, C-N-H e C-O-C |
| $\pi \rightarrow \pi^*$ | 180 | 10000 | C=C |
| $\pi \rightarrow \pi^*$ | 220 | 20000 | C=C-C=C |
| $\pi \rightarrow \pi^*$ | 220 | 20000 | C=C-C=O |
| $n \rightarrow \pi^*$ | 280 | 20 | C=O |
| $n \rightarrow \pi^*$ | 350 | 100 | N=N |
| $n \rightarrow \pi^*$ | 350 | 30 | C=C-C=O |
| $n \rightarrow \pi^*$ | 660 | 200 | N=O |

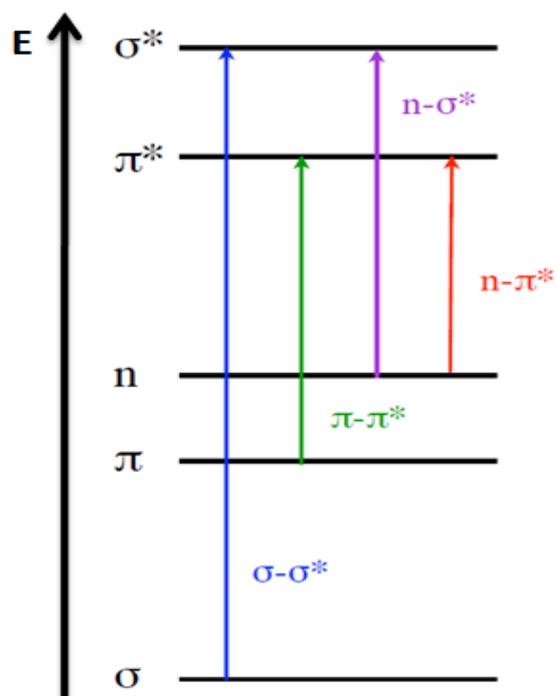


Figura 4. Representação esquemática dos tipos de transições eletrônicas (CORRÊA, 2010).

1.3.1.1.1. Derivados da benzofenona

As benzofenonas (BFs) são cetonas aromáticas, naturais ou sintéticas, de grande interesse científico e com inúmeras aplicações devido à variedade de suas propriedades biológicas e físico-químicas. São formadas por dois anéis aromáticos ligados por um grupo carbonila (Figura 5), podendo apresentar diferentes substituintes que alteram as características estereoeletrônicas e, com isso, suas propriedades (MANTAS, BLANCO & FERRETI, 2004)(CORRÊA, 2010).

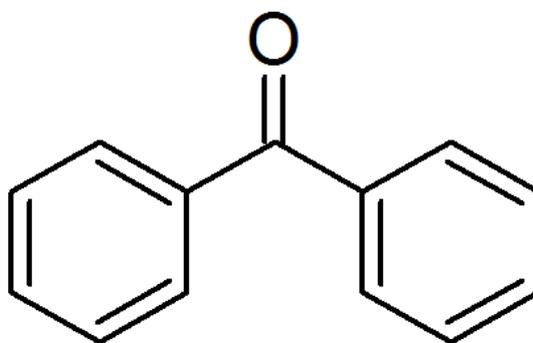


Figura 5. Estrutura química da benzofenona (BF).

As BFs possuem a habilidade de absorver e dissipar a radiação UV e, por isso, são muito utilizadas como filtros UV na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (COX, DIMITRIOS & KELLY, 2008).

Os seguintes derivados de BF estão incluídos na lista vigente de filtros UV permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA de nº 47 de 16 de março de 2006: benzofenona-3 (BF-3; 2-hidróxi-4-metoxi-benzofenona; oxibenzona); benzofenona-8 (BF-8; 2,2'-dihidróxi-4-metoxi-benzofenona); benzofenona-4 (BF-4; ácido 2-hidróxi-4-metóxi-5-sulfônico; sulisobenzona) e seu sal sódico, benzofenona-5 (BF-5; sulisobenzona sódica); e 2-(4'-dietilamino-2'-hidróxi-benzoil)-benzoato de hexila (DHHB).

As BFs possuem o grupo carbonila (função cetona) ligado a dois anéis aromáticos (Figura 5) e apresentam transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, que resultam em dois picos na faixa do UV, geralmente um na faixa do UVA e outro na faixa do UVB, por isso são classificadas como filtros de amplo espectro.

A benzofenona-3 (BF-3) (Figura 6) foi um dos primeiros filtros UV, de amplo espectro (filtro solar com absorção na região do UVA e UVB), empregado em formulações fotoprotetoras e atualmente ainda é muito utilizada (SUZUKI *et al.*, 2005; MOLINA-MOLINA *et al.*, 2008).

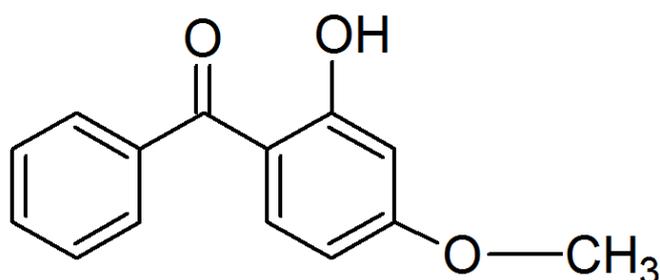


Figura 6. Estrutura química da benzofenona-3 (BF-3).

Já o DHHB (Figura 7), derivado de BF recentemente aprovado pela ANVISA, possui seu pico máximo de absorção em 354 nm, ou seja, é um filtro solar com absorção apenas na região do UVA (TUCHINDA *et al.*, 2006).

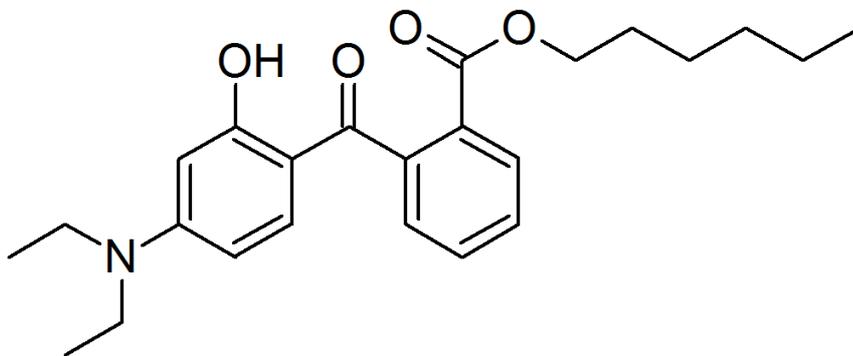


Figura 7. Estrutura química do DHHB.

Diversas publicações apontam a presença sistêmica de benzofenonas após aplicação cutânea. A benzofenona-3 é o principal alvo desses estudos, devido à sua elevada aplicação em formulações fotoprotetoras. Diversas publicações evidenciam a absorção, bioacumulação, metabolização e excreção da benzofenona-3 (GONZALEZ, FARBROT & LARKÖ, 2002; JANJUA *et al.*, 2004; SCHLUMPF *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2005; KAWAMURA *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 2006; KUNZ & KENT, 2006; JEON *et al.*, 2008; MOLINA-MOLINA *et al.*, 2008).

Do ponto de vista toxicológico, diversos estudos avaliaram a atividade das benzofenonas como desreguladores endócrinos. O foco principal para os estudos de desregulação endócrina é relacionado ao estímulo dos receptores de estrogênio (MOLINA-MOLINA *et al.*, 2008).

Empregando técnicas de modelagem molecular, Corrêa (2010) estudou uma série de derivados de BF e obteve informações estruturais e eletrônicas correlacionadas com a atividade estrogênica desses derivados. Segundo Corrêa (2010), a atividade estrogênica, indesejável para a fotoproteção, é favorecida em benzofenonas *di-para*-hidroxiladas. A alta densidade eletrônica na posição *para* dos anéis é uma característica importante para a interação com o receptor de estrogênio.

Ainda, no mesmo trabalho, Corrêa (2010) calculou o espectro eletrônico teórico da benzofenona (BF) e de dois de seus derivados (BF-3 e BF-8) utilizando a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) e destacou a necessidade da realização de novos cálculos com intuito de se conseguir resultados mais acurados para esses derivados e também a importância da avaliação do efeito dos substituintes no espectro eletrônico de absorção UV de derivados da BF.

Segundo Corrêa (2010), a obtenção de dados relacionados com a atividade estrogênica e com a absorção UV de derivados da BF permite fundamentar propostas de modificação estrutural para o planejamento racional de novos fotoprotetores mais eficientes e seguros.

1.3.1.1.2. Derivados do ácido 4-aminobenzóico (PABA)

O ácido 4-aminobenzóico (PABA) e seus derivados atuam como absorventes de radiação na faixa de UVB. O PABA foi o primeiro filtro solar utilizado e um dos primeiros aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) (COSTA & LACAZ, 2001; BALOGH *et al.*, 2011) e tornou-se um dos principais ativos presente em fotoprotetores comercializados (BALOGH *et al.*, 2011).

Atualmente, embora ainda seja permitida a sua utilização em alguns países, incluindo o Brasil, atualmente, o PABA não é mais permitido pelo FDA e quase desapareceu de formulações fotoprotetoras devido ao seu alto potencial alergênico e fotoalergênico (PALM & O'DONOGHUE, 2007; WATERS *et al.*, 2009).

O octil dimetil PABA (ODP) (Figura 8), único derivado do PABA aprovado atualmente pelo FDA, apresenta seu máximo de absorção em 311 nm e também elevada substantividade (PALM & O'DONOGHUE, 2007).

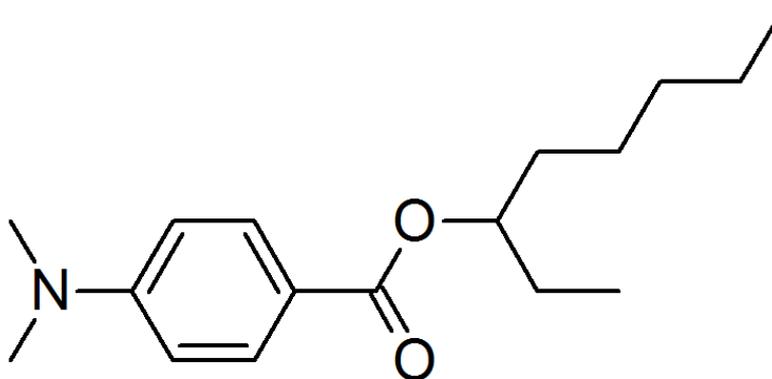


Figura 8. Estrutura química do octil dimetil PABA (ODP).

Na década de 1970, devido a sua eficiência de absorção na faixa do UVB, o ODP era o filtro solar químico mais popular disponível. No entanto seu uso tem sido substituído, a partir da década de 1980, com o surgimento dos protetores solares livres de PABA, chamados “PABA-free” (MICHALUN & MICHALUN & SILVA, 2011). Embora apresente potencial alergênico reduzido em relação ao PABA, o ODP ainda é responsável por irritação na pele e casos

de alergia de fotocontato (WELLER & FREEMAN, 1984; BALOGH *et al.*, 2011; MICHALUN & MICHALUN & SILVA, 2011).

Coelho e col (2008) realizaram a inclusão do ODP em ciclodextrinas e em diferentes montmorilonitas e observaram que o processo de inclusão pode melhorar a sua funcionalidade e uso comercial. Os compostos de intercalação apresentaram uma redução da absorção sistêmica, baixa irritabilidade dérmica e maior resistência à água.

1.3.1.2. *Filtros solares inorgânicos*

Os filtros inorgânicos são representados por dois óxidos metálicos, óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) (FLOR & DAVOLOS & CORREA, 2007). Por tratar-se de partículas, possuem a capacidade de refletir e dispersar a luz UV que incide sobre a superfície cutânea, reduzindo a quantidade de energia que é absorvida pela pele e, dessa forma, minimizando seus efeitos deletérios. Por serem materiais semicondutores, também são capazes de absorver radiação UV. O processo de absorção ocorre por meio de transições eletrônicas entre as bandas de valência e de condução (FLOR & DAVOLOS & CORREA, 2007; PINTO *et al.*, 2010).

Os óxidos metálicos são considerados filtros seguros, pois apresentam baixo potencial de irritação. Além disso, são filtros de fotoestabilidade elevada, ou seja, possuem a capacidade de manter a eficácia fotoprotetora após longos períodos de radiação. Por outro lado, formam uma película de coloração branca, tornando-os pouco atrativos quando aplicados na pele (FLOR & DAVOLOS & CORREA, 2007).

Nos últimos anos, os fabricantes de cosméticos começaram a usar as formas micro ou nanométricas destes óxidos, pois, além de melhorar a uniformidade do filme sobre a pele, o mesmo se torna invisível devido ao menor tamanho de partícula. A eficácia fotoprotetora também é melhorada, pois a redução do tamanho de partícula diminui a reflexão da radiação visível (diminui o branco), porém aumenta a reflexão e absorção da radiação UV

(RIBEIRO, 2006; FLOR & DAVOLOS & CORREA, 2007; NEWMAN & STOTLAND & ELLIS, 2009).

1.3.1.2.1. Dióxido de titânio

O dióxido de titânio (TiO_2) é um pigmento branco muito utilizado como filtro solar, pois possui capacidade de refletir, dispersar e, também, absorver radiação UV (PINTO *et al.*, 2010).

Devido ao seu alto índice de refração, o TiO_2 possui a capacidade de refletir e dispersar a radiação em diversas faixas (ROWE, 2009). O comprimento de onda preferencialmente disperso é dependente do tamanho de partícula. Quanto menor o tamanho de partícula, menor o comprimento de onda disperso. Essa relação entre o tamanho de partícula e o espalhamento de luz é importante para se conseguir máximo benefício fotoprotetor com melhor aparência, ou seja, maior dispersão da radiação UV com baixa reflexão da radiação visível. A reflexão da radiação visível é responsável pela aparência branca deixada na pele após aplicação do protetor solar (HEWITT, 1992).

O TiO_2 também é capaz de absorver a radiação UV pelo intervalo de energia entre bandas da estrutura eletrônica (bandas valência e condução), que corresponde ao comprimento de onda de 385 nm (polimorfo anatase) (DUNFORD *et al.*, 1997; SERPONE & SALINARO & EMELINE, 2001; PINTO *et al.*, 2010).

Embora o TiO_2 seja um filtro solar físico considerado seguro, quando irradiado (comprimentos de onda < 385 nm) é capaz de gerar radicais livres, como radicais superóxido, grupo hidroxila e oxigênio singleto (DUNFORD *et al.*, 1997; SERPONE & SALINARO & EMELINE, 2001; PINTO *et al.*, 2010).

Diversos estudos apontam que o TiO_2 pode catalisar danos oxidativos ao DNA e, desta forma, ao mesmo tempo em que protege a pele pela reflexão e absorção da radiação UV, pode causar outras formas de dano ao DNA (DUNFORD *et al.*, 1997; SERPONE & SALINARO & EMELINE, 2001; PINTO *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que existe uma grande controvérsia quanto à segurança e penetração da pele de nanopartículas de TiO_2 . Diversos trabalhos investigam a penetração do TiO_2 encontrado em protetores solares, contudo ainda não existem evidências de penetração significativa de partículas nanométricas desse filtro (SERPONE & SALINARO & EMELINE, 2001; NEWMAN & STOTLAND & ELLIS, 2009; SADRIEH *et al.*, 2010; SENZUI *et al.*, 2010; MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2011).

1.4. ARGILAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO

As argilas minerais apresentam diferentes aplicações e uso, devido à facilidade com que são modificadas e ao seu baixo custo. Em formulações para uso tópico, as argilas minerais podem atuar como agentes protetores da pele, pois são capazes de aderir à pele e formar um filme protetor mecânico contra agentes químicos e físicos externos. Devido à capacidade absorvente, as argilas também são utilizadas como ativos cosméticos, reduzindo a oleosidade da pele (CARRETERO, 2002).

As argilas são silicatos lamelares que fazem parte da família dos filossilicatos. Os silicatos são compostos formados por átomos de silício e oxigênio, caracterizados por cristais tetraédricos, representados por SiO_4 . Os tetraedros se polimerizam formando diferentes grupos de compostos, com arranjos de tetraedros SiO_4 isolados, duplos, anelados, tridimensionais e lamelares. Os silicatos lamelares possuem arranjo de folhas tetraédricas e octaédricas e são classificados como filossilicatos (FONSECA & AIROLDI, 2003; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006).

Os filossilicatos são constituídos, essencialmente, por átomos de alumínio e magnésio, podendo conter outros elementos, como Fe, Ca, Na, K além de moléculas de água, e são classificados em grupos de acordo com o tipo de lamela 1:1 ou 2:1, carga da lamela e tipo de espécie interlamelar. Esses grupos são, ainda, subdivididos de acordo com o tipo de camada octaédrica, composição química, geometria da superposição das camadas individuais e

região interlamelar (FONSECA & AIROLDI, 2003; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006).

O tipo de lamela 2:1 é constituído por duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, que são unidas entre si por átomos de oxigênio comuns a ambas as folhas. O grupo das esmectitas apresenta tipo de lamela 2:1 e tem a montmorilonita (MMT) como subgrupo (FONSECA & AIROLDI, 2003; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006; COELHO & SANTOS & SANTOS, 2007; SILVA & FERREIRA, 2008).

As esmectitas são filossilicatos expansíveis que permitem várias reações no espaço interlamelar, envolvendo processos de troca iônica e intercalação de moléculas neutras, complexos metálicos, polímeros ou organocátions e, por isso, uma grande diversidade de reações e, portanto, novos materiais podem ser explorados (FONSECA & AIROLDI, 2003; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006; COELHO & SANTOS & SANTOS, 2007; SILVA & FERREIRA, 2008).

1.4.1. Montmorilonita

Bentonita é o termo usado para designar uma argila composta essencialmente por minerais do grupo das esmectitas e com alto teor de montmorilonita (MMT) (PAIVA & MORALES & DÍAZ, 2008).

A MMT é uma argila aniônica com estrutura lamelar, que permite a geração de materiais intercalados ou sistemas esfoliados pela delaminação das argilas. A carga negativa das lamelas é proveniente da substituição isomórfica natural de alguns átomos de alumínio dos octaedros por átomos de magnésio. Cada substituição resulta em uma carga negativa (valência livre) devido à substituição de um átomo trivalente (Al, valência 3) por um divalente (Magnésio, valência 2). As cargas negativas são equilibradas por contra-íons positivos, geralmente, por cátions sódio (Na^+), que ficam localizados no espaço interlamelar da argila e possibilitam a troca por cátions orgânicos (AGUIAR & NOVAES & GUARINO, 2002; FONSECA & AIROLDI, 2003; LOPES & GUILHERME, 2004; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006; COELHO &

SANTOS & SANTOS, 2007; PAUL & ROBESON, 2008; SILVA & FERREIRA, 2008; JOSHI *et al.*, 2009; JOSHI & KEVADIYA & BAJAJ, 2010).

Para a MMT, a substituição isomórfica é responsável por 80% do total da sua capacidade de troca catiônica (CTC). A CTC é a quantidade de cátions, que o silicato pode adsorver e trocar, permitindo a troca de íons sódio por cátions orgânicos. A MMT também possui muito grupos hidroxila e grande área superficial no espaço interlamelar, com isso apresenta boa capacidade de troca catiônica (AGUIAR & NOVAES & GUARINO, 2002; FONSECA & AIROLDI, 2003; LOPES & GUILHERME, 2004; PAIVA & MORALES & GUIMARÃES, 2006; COELHO & SANTOS & SANTOS, 2007; PAUL & ROBESON, 2008; SILVA & FERREIRA, 2008; JOSHI *et al.*, 2009; JOSHI & KEVADIYA & BAJAJ, 2010).

A CTC da montmorilonita sódica (MMT-Na), medida experimentalmente em diferentes trabalhos, é de 90-100 mmol/100 g de MMT. Maes e colaboradores (1979) utilizaram o método alquilamônio para avaliar a CTC da MMT sódica e observaram valores de $100,8 \pm 1,1$ mmol/100 g em água e $101,0 \pm 2,5$ mmol/100 g na mistura 1:1 de água e etanol. Vazquez e colaboradores (2008) determinaram a CTC de 95,1 mmol/100 g de argila, através do método de acetato de amônia. Kevadiya e colaboradores (2009) utilizaram o mesmo método e observaram o valor de CTC igual a 91 mmol/100 g de MMT (MAES & STUL & CREMERS, 1979; VAZQUEZ *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2009)

A MMT-Na (Figura 9) apresenta caráter hidrofílico, mas devido a sua CTC é possível a organomodificação do material, isto é, a troca de íons sódio por sais de amônio quartenário. Deste modo, a MMT adquire um caráter hidrofóbico e apresenta expansão do espaço entre as lamelas, facilitando, assim, a intercalação de diferentes materiais (PAUL & ROBESON, 2008).

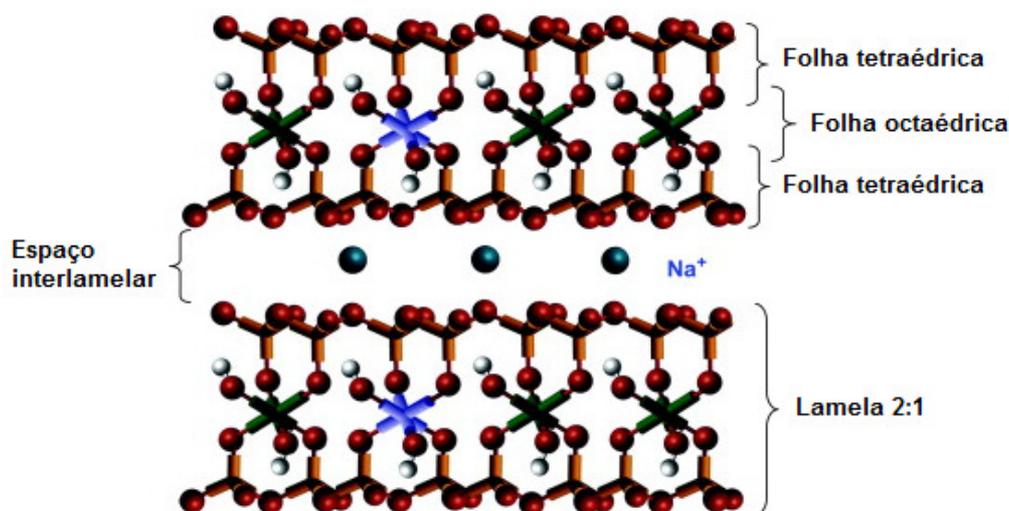


Figura 9. Estrutura da montmorilonita sódica (PAUL & ROBESON, 2008).

A MMT foi empregada em diversos estudos com função de carreador de ativos farmacêuticos visando sistemas de liberação modificada ou com o objetivo de se obter novos materiais com propriedades melhoradas (DEL HOYO & RIVES & VICENTE, 1996; DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001; KLIKA *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2010; JOSHI & KEVADIYA & BAJAJ, 2010; KEVADIYA, JOSHI & *et al.*, 2010; KEVADIYA, PATEL & *et al.*, 2010).

1.4.2. Complexos de inclusão formados por argila e filtros solares

O interesse de pesquisadores na intercalação de ativos farmacêuticos em argilas vem crescendo uma vez que os materiais formados apresentam novas propriedades físico-químicas (DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001; GALLAGHER & LEE, 2006; JOSHI *et al.*, 2009; JOSHI & KEVADIYA & BAJAJ, 2010).

A intercalação de compostos orgânicos em silicatos lamelares (compostos inorgânicos) permite o desenvolvimento de compósitos, ou seja, híbridos orgânico-inorgânicos, que possuem propriedades de ambos

componentes, hospedeiro inorgânico e hóspede orgânico, em um único material (JOSHI *et al.*, 2009).

As vantagens esperadas pela inclusão de filtros em argilas ou em outros materiais, como ciclodextrinas e partículas poliméricas, são diversas, como melhorar propriedades como fotoestabilidade, substantividade, absorção da radiação UVA e UVB, facilitar a formulação, reduzir o contato dos filtros com a pele e melhorar a distribuição do filme formado pelo protetor solar na pele (ANSELMINI *et al.*, 2002; PERIOLI *et al.*, 2006).

Estudos da intercalação de filtros solares e argilas apontaram que a formação de complexos de inclusão pode ser uma estratégia efetiva para a melhora da eficácia, estabilidade e segurança de fotoprotetores (DEL HOYO & RIVES & VICENTE, 1996; DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001; PERIOLI *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2008).

Soares (2003) evidenciou que a presença da argila nas formulações fotoprotetores evitou a ocorrência de irritação, considerada clássica para os derivados de PABA. Pesquisas realizadas com os filtros antranilato de metila e ODP relataram que a inclusão dos filtros em MMT-Na ou organomodificada melhora o FPS de formulações fotoprotetoras contendo os complexos de inclusão em comparação com formulações contendo os filtros livres (COELHO *et al.*, 2008).

Complexos formados por cinamato de etila intercalado em MMT apresentaram uma melhora significativa da absorção UV, principalmente na faixa de 190 a 320 nm, quando comparado com o filtro e a argila livres (DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001). É importante ressaltar que no estudo, a concentração do filtro no complexo filtro/argila era menor do que a analisada com o filtro livre (eficiência de intercalação de ~ 8 a 8,6 g cinamato de etila/100 g de montmorilonita) (DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001). O complexo cinamato de metila/MMT também apresentou melhora na absorção UV (DEL HOYO & RIVES & VICENTE, 1996).

A intercalação do PABA em hidrotalcitas (hidróxido duplo lamelar, argila aniônica) também foi estudada e formulações preparadas com os complexos formados apresentaram melhor eficácia fotoprotetora em amplo espectro,

reduzido contato do filtro com a pele, diminuindo possíveis efeitos alérgicos, e maior fotoestabilidade (PERIOLI *et al.*, 2006).

Como a MMT apresenta uma banda de absorção larga na faixa do UV abaixo de ~330 nm, atribuída a processos de transferência de carga na estrutura cristalina da argila (DEL HOYO & VICENTE & RIVES, 2001), quando realiza-se a intercalação do filtro na argila, é possível observar uma maior intensidade de absorção da radiação UV no complexo formado do que nos materiais isolados.

1.5. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia tem avançado rapidamente nos últimos anos e vem sendo estudada e aplicada em diversas áreas. Ela compreende a síntese, processamento, caracterização e utilização de materiais com dimensões da ordem de 0,1 a 100 nm. O princípio da nanotecnologia é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Os nanosistemas são um tipo de nanomateriais híbridos, que podem possuir natureza inorgânica/inorgânica (COZZOLI *et al.*, 2004; ARUMUGAM *et al.*, 2007; DANIEL & FROST & ZHU, 2008; MÉNESI *et al.*, 2008; DVININOV *et al.*, 2009) ou inorgânica/orgânica (JOSÉ & PRADO, 2005; PASSOS *et al.*, 2011; DOS SANTOS ALMEIDA *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2012), sendo que um deles possua dimensões na ordem de nanômetros. A combinação desses materiais pode gerar propriedades que não são encontradas em um único constituinte (JOSÉ & PRADO, 2005).

1.5.1. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção

No âmbito da fotoproteção, o desenvolvimento de nanomateriais vem sendo estudado como estratégia para a obtenção de novos ativos com eficácia

fotoprotetora melhorada (BOLZINGER & BRIANÇON & CHEVALIER, 2011; WANG & TOOLEY, 2011; HANNO & ANSELMINI & BOUCHEMAL, 2012).

A preocupação em torno do uso desses materiais é bastante relevante para o emprego dos mesmos em formulações fotoprotetoras, sendo que a toxicidade potencial e penetração percutânea de nanomateriais através da pele são parâmetros importantes associados à segurança do uso de protetores solares nanométricos (WANG & TOOLEY, 2011).

Partículas nanométricas de TiO₂ e de ZnO apresentam maior proteção UV e redução do branco deixado na pele pelo protetor solar quando comparadas às partículas convencionais de tamanho maior (WANG & TOOLEY, 2011).

A redução de tamanho de partícula dos filtros inorgânicos proporciona a formação de um filme protetor mais uniforme na pele. Evidências sugerem que TiO₂ e ZnO nanométricos são seguros quando aplicado à pele humana intacta. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a penetração de nanomateriais na pele comprometida e doente (WANG & TOOLEY, 2011).

Nanopartículas de poliamida contendo os filtros orgânicos Parsol®MCX (4-metóxi-cinamato de 2-etil-hexila) e/ou Parsol®1789 (metoxibenzoilmetano de butila) associados à vitamina E (α -tocoferol), apresentaram melhor fotoestabilidade quando comparadas aos filtros livres (HANNO & ANSELMINI & BOUCHEMAL, 2012). Em estudos realizados em pele de porco, foi observada reduzida permeação dos nanomateriais na pele. Esse resultado aponta que além de maior segurança, as nanopartículas proporcionam maior substantividade ao protetor solar (HANNO & ANSELMINI & BOUCHEMAL, 2012).

1.6. Avaliação do potencial fotoprotetor em levedura

Estudos demonstraram que a radiação UVB causa efeitos letais e mutagênicos em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MELO & LEITAO & PADULA, 2004; SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2010). As leveduras apresentam similaridade com as células de mamíferos em relação aos genes de reparação do DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2005). Deste modo, a avaliação da participação

de ativos fotoprotetores nos efeitos causados pela radiação UVB em modelo *Saccharomyces cerevisiae* permite a investigação do potencial fotoprotetor (MELO & LEITAO & PADULA, 2004; SOUZA, 2009).

O potencial fotoprotetor pode ser avaliado por meio da observação dos efeitos letais e mutagênicos induzidos pela radiação UVB em leveduras pré-tratadas com os ativos que se deseja estudar em comparação com a exposição UVB de leveduras não tratadas (PINTO *et al.*, 2010).

1.6.1. Estudos com TiO₂ e MMT-Na

Pinto e col. (2010) investigaram os efeitos letais e mutagênicos induzidos pelo TiO₂ exposto à radiação UVB em modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, em estudos não publicados de Paiva e col. (2013), também com o modelo *S. cerevisiae*, o potencial mutagênico e os efeitos letais da MMT-Na irradiada por UVB foram investigados.

Os dados obtidos nessas investigações indicaram o efeito fotoprotetor do TiO₂ e da MMT-Na resultante do aumento da sobrevivência das leveduras em relação ao efeito letal da radiação UVB. Contudo, os índices de mutagênese das leveduras pré-tratadas com TiO₂ e MMT-Na foram superiores ao índice da levedura não tratada, ou seja, ambos os materiais potencializam o efeito mutagênico da radiação UVB (PAIVA *et al.*, 2013).

Paiva e col (2013) também avaliaram a sobrevivência e mutagenicidade de leveduras pré-tratadas com a associação (mistura física) de TiO₂ e MMT-Na. Surpreendentemente, em comparação com os materiais isolados, a mistura física de TiO₂ e MMT-Na aumentou significativamente a sobrevivência (Figura 10) das leveduras, bem como reduziu expressivamente a mutagenicidade (Figura 11).

Segundo os resultados obtidos por PAIVA e col. (2013), é possível observar na Figura 10 que a cepa CD138 de *S.cerevisae* se mostrou mais sensível à exposição aos raios UVB quando pré-tratada com MMT-Na ou TiO₂, sendo que os efeitos letais foram mais acentuados para a MMT-Na. O mesmo comportamento foi observado para mutagênese (Figura 11).

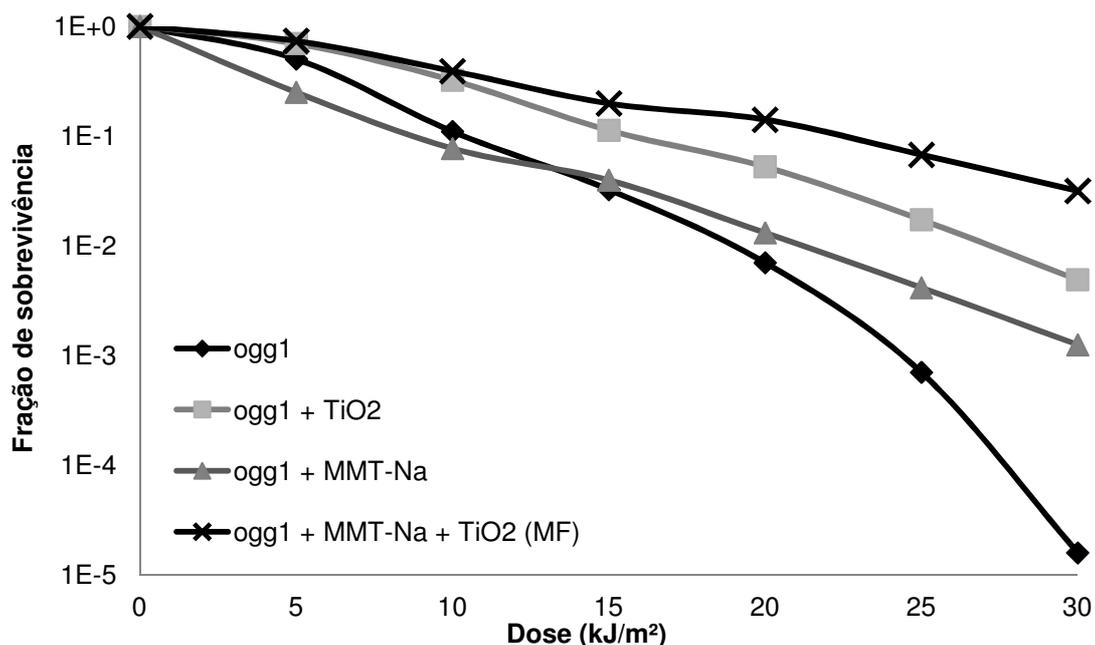


Figura 10. Sobrevivência da cepa CD138 (*ogg1*) de *S.cerevisae* após exposição UVB, pré-tratadas ou não com TiO₂, MMT-Na ou a mistura física (MF) de TiO₂ e MMT-Na. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos (Resultados cedidos por PAIVA e col., 2013).

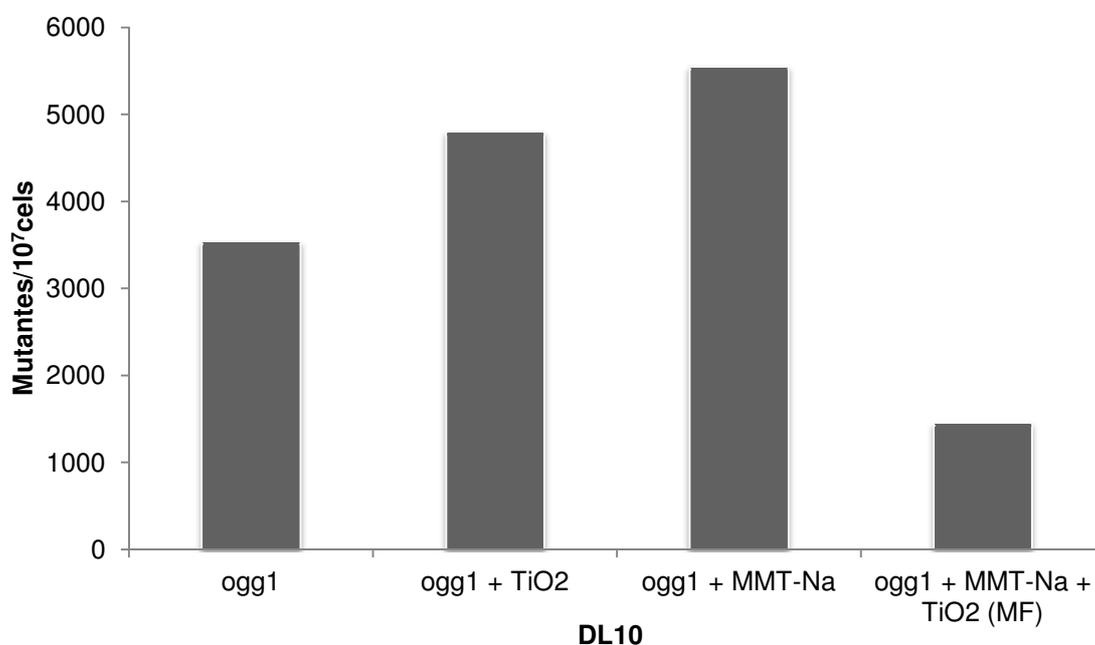


Figura 11. Mutagênese da cepa CD138 (*ogg1*) de *S.cerevisae* após exposição UVB, pré-tratadas ou não com TiO₂, MMT-Na ou a mistura física (MF) de TiO₂ e MMT-Na. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos (Resultados cedidos por PAIVA e col., ainda não publicados).

1.7. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular é uma ferramenta de predição do comportamento de sistemas moleculares, por investigação de parâmetros geométricos e eletrônicos. Emprega-se um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares e está associada a técnicas computacionais, que possibilitam o cálculo de sistemas mais complexos e, também, a representação tridimensional dos sistemas analisados (LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001; SANTOS, 2001; ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

A modelagem molecular permite uma melhor compreensão do comportamento espectral de diferentes compostos (BAUGHMAN et al., 2009; JACQUEMIN et al., 2009). Essa ferramenta auxilia na busca por compostos com habilidade de absorver radiação na faixa desejada (WALTERS et al., 1997; BAUGHMAN et al., 2009; JACQUEMIN et al., 2009) e permite estabelecer relações estrutura-propriedade de absorção UV (JACQUEMIN et al., 2009). Além disso, possibilita a predição e interpretação das propriedades do estado excitado de diferentes tipos de moléculas (WALTERS et al., 1997; IMPROTA & SANTORO, 2005; BARONE & POLIMENO, 2007; AMAT et al., 2009; JACQUEMIN et al., 2009; PROMKATKAEW et al., 2009).

Como estratégia de modelagem molecular para análise do espectro de absorção UV de diferentes compostos, utiliza-se a química computacional que engloba cálculos de mecânica molecular e mecânica quântica (LEACH, 2001).

1.7.1. Mecânica molecular

Métodos de mecânica molecular (MM), também conhecidos como métodos de campo de forças, calculam a energia do sistema em função das posições nucleares. É considerada a aproximação de Born-Oppenheimer, em que os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente. A MM é caracterizada por considerar os movimentos nucleares e não tratar os movimentos eletrônicos explicitamente, pois assume

que os elétrons se movimentam rapidamente e se adaptam a posição dos núcleos, por isso, a MM não pode fornecer propriedades que dependem da distribuição eletrônica da molécula (LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001).

Na MM, a energia da molécula é descrita pela superfície de energia potencial em termos das posições nucleares (COELHO et al., 1999; LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001; CARVALHO et al., 2003).

O modelo de mecânica molecular representa as moléculas como esferas (átomos) interligadas por molas (ligações químicas), isto é, que os átomos são ligados por forças potenciais harmônicas. Essas forças ou interações são descritas por funções de energia potencial parametrizadas no campo de forças. As funções de energia potencial são calculadas independentemente e somadas para se obter a energia total da molécula (COELHO et al., 1999; LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001; CARVALHO et al., 2003).

Os campos de força possibilitam calcular a energia relacionada com determinada conformação de uma molécula, e para isso se baseiam em parâmetros referentes a interações ligantes, como comprimento e ângulo de ligações e ângulos de torsão (diedros), e interações não-ligantes, como eletrostáticas e de van der Waals. Os cálculos utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de energia potencial, cujo formalismo matemático está baseado num modelo de mecânica clássica de estrutura molecular (LEACH, 2001; RODRIGUES, 2001; CARVALHO et al., 2003).

Um campo de forças adequado a uma investigação em particular deve ser cuidadosamente selecionado. Dentre os campos de forças comumente presentes em programas de modelagem computacional, o MMFF (do inglês, *Merck Molecular Force Field*) é direcionado para estudos de sistemas orgânicos e biopolímeros. A parametrização do MMFF94 foi baseada em dados experimentais e em cálculos quânticos acurados. Este campo de forças é capaz de gerar informações quantitativas sobre conformações e geometrias moleculares (HEHRE, 2003; HALGREN, 1996).

1.7.2. Mecânica quântica

Em 1926, a mecânica quântica teve seu início marcado pelo físico austríaco Erwin Schrödinger (1887-1961), com a publicação de uma equação que determina a função de onda quântica de um sistema. A equação de onda, ou equação de Schrödinger, considera a natureza ondulatória dos elétrons no cálculo da energia total do sistema (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES & BOTTI, 2010).

Cada função de onda, representada pela letra grega psi (Ψ) corresponde a um estado diferente para o elétron. E, para cada estado há uma energia e uma posição particular, que pode ser calculada pela equação de onda. A função de onda ao quadrado (Ψ^2) indica a densidade de probabilidade de um elétron, isto é, a probabilidade de se encontrar um elétron em uma localização (r) específica no espaço (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES; BOTTI, 2010).

Os métodos de mecânica quântica descrevem as moléculas em termos de interações entre o núcleo e os elétrons, e o ponto de partida para o estudo desses métodos é a equação de Schrödinger (Eq. 1) (HEHRE, 2003).

$$[-1/2 \nabla^2 - Z/r]\Psi(r) = E\Psi(r) \quad \text{Equação 1}$$

A primeira contribuição, entre colchetes, descreve a energia potencial e cinética de um elétron a uma distância r do núcleo de carga Z . E é a energia eletrônica e Ψ a função de onda que descreve os movimentos eletrônicos tão plenamente quanto possível, em função das coordenada eletrônica (r) (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES; BOTTI, 2010).

A Equação 2 apresenta uma forma simplificada da equação de Schrödinger para um sistema de muitos átomos (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES; BOTTI, 2010).

$$H\Psi(r) = E\Psi(r) \quad \text{Equação 2}$$

Na equação 2, \hat{H} é o operador Hamiltoniano, que representa a energia potencial e cinética dos elétrons a uma distância r do núcleo. No \hat{H} , as unidades atômicas são dadas em função da carga e massa nuclear, da massa dos elétrons e da distância entre o núcleo e os elétrons (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES; BOTTI, 2010).

A equação de Schrödinger tem uma solução exata apenas para o átomo de hidrogênio. Na maioria dos casos, como em sistemas multieletrônicos e multinucleares, a solução da equação correspondente torna-se tão complexa e demorada, que, durante anos, físicos e químicos buscaram aproximações para resolver o problema de muitos corpos. Um exemplo é a aproximação de Born-Oppenheimer, que assume a disparidade entre a massa e o movimento dos núcleos e elétrons, para tratar os núcleos como partículas fixas e bem localizadas. Os núcleos possuem movimentos lentos quando comparados à velocidade dos elétrons. Com isso, para cada arranjo nuclear, r , fixado, tem-se uma densidade ou nuvem eletrônica associada. O arranjo nuclear é determinado pela geometria de equilíbrio, isto é, uma distância internuclear de equilíbrio (TOSTES, 1998; LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES & BOTTI, 2010).

Dois diferentes métodos quânticos, *ab initio* e semi-empíricos, fornecem parâmetros quânticos e possuem aplicação em química computacional. Esses métodos permitem a definição de um grande número de propriedades atômicas e moleculares, caracterizando propriedades relacionadas à reatividade, forma e modo de ligação de fragmentos e substituintes moleculares. Através desses métodos, uma série de descritores moleculares é obtida, possibilitando a identificação de muitas propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações (ARROIO, HONÓRIO & SILVA, 2010).

Os métodos *ab initio* representam um tratamento teórico mais rigoroso e fornecem informações mais precisas sobre o comportamento eletrônico. O primeiro método desenvolvido de cálculo de estrutura eletrônica foi o método Hartree-Fock (HF). São cálculos realizados a partir de constantes físicas fundamentais, sem o uso de parâmetros experimentais. Sendo assim, exigem um

custo computacional maior em comparação aos métodos semi-empíricos (ARROIO, HONÓRIO & SILVA, 2010).

Os métodos semi-empíricos são baseados no formalismo dos métodos *ab initio*, no entanto, possuem simplificação dos cálculos, pois utilizam parâmetros obtidos de dados experimentais. Com isso, consegue-se uma redução dos custos de memória e tempo computacional e aumento na velocidade de processamento dos cálculos (MORGON & COUTINHO, 2007). Entre os métodos semi-empíricos, os mais utilizados atualmente são AM1, PM3, RM1 e PM6.

1.7.3. Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Em 1964, o norte americano de origem austríaca Walter Kohn e seu aluno francês Pierre Hohenberg publicaram um artigo com dois teoremas que reformulavam a mecânica quântica, baseando-se na densidade eletrônica ao invés das funções de onda. Os teoremas determinavam que todas as grandezas físicas medidas em um sistema são unicamente determinadas pela densidade eletrônica, isto é, são funcionais de densidade. Porém, Hohenberg e Kohn apenas provavam que os funcionais existiam, mas não os determinavam na prática para um sistema real. No ano seguinte, outro artigo foi publicado por Kohn, trazendo a solução exata para se encontrar os funcionais e também a aproximação da densidade local (LDA, do inglês Local Density Approximation), que é baseada na densidade eletrônica, no qual os núcleos são substituídos por uma carga positiva contínua e constante (MARQUES & BOTTI, 2010).

A teoria de Thomas-Fermi, desenvolvida no final de 1920, continha alguns desses elementos presentes na Teoria do Funcional da Densidade, porém foram esses dois artigos de Kohn que legitimaram os seus fundamentos (MORGON; COUTINHO, 2007; MARQUES & BOTTI, 2010).

Além dos desenvolvimentos teóricos, pode ser observado, nas últimas décadas, um grande avanço no desenvolvimento computacional. Com isso, atualmente é possível realizar cálculos cada vez mais sofisticados de sistemas cada vez maiores (MARQUES & BOTTI, 2010).

Desta forma, o método DFT tornou-se importante para o estudo das propriedades estruturais e eletrônicas das moléculas, pois apresenta resultados com precisão química aceitável e boa correlação com resultados experimentais. Utiliza a densidade eletrônica como variável necessária para o cálculo das propriedades eletrônicas, diferente da Teoria de Hartree-Fock (HF), que utiliza a função de onda de N elétrons, em que N representa o número de elétrons de uma molécula (MORGON & COUTINHO, 2007).

Para o estudo de moléculas em estados excitados, em que são descritas transições eletrônicas, são utilizados métodos como a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT, do inglês Time Dependent Density Functional Theory).

A TD-DFT se baseia em princípios da mecânica quântica dependente do tempo utilizando funcionais da densidade. Devido ao sucesso de aplicação da DFT em estados estacionários, a descrição de estados dependentes do tempo (excitados) em termos do funcional da densidade tem sido empregada e a fotoabsorção de átomos têm sido tratada com sucesso nessa abordagem (DAMASCENO, 2009).

O cálculo das intensidades de absorção é realizado considerando-se as probabilidades de absorção entre os estados de energia envolvidos na transição.

Robert Sanderson Mülliken, um dos pioneiros no trabalho da teoria da orbital molecular, relacionou a quantidade de absorção com uma medida de intensidade, à qual denominou força de oscilador (PAULA, 2003).

Ao estender a eficiência dos cálculos de DFT para estados excitados, a TD-DFT permite uma boa concordância entre espectros calculados e experimentais (RUNGE & GROSS, 1984; GROSS & KOHN, 1990; JACQUEMIN *et al.*, 2009; BAMGBELU & WANG & LESZCZYNSKI, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Os filtros solares em estudo neste trabalho apresentam algumas características não desejadas para a fotoproteção, como a atividade estrogênica evidenciada em estudos com a benzofenona-3 (BF-3), as irritações cutâneas e reações fotoalérgicas do octil-dimetil-PABA (ODP) e a geração de radicais livres induzida pelo dióxido de titânio (TiO_2) quando irradiado por raios UV.

Tendo em vista a ampla utilização desses filtros solares e a importância do uso de protetores solares como estratégia para a prevenção de danos causados pela radiação, inclusive o câncer de pele, julga-se necessário contribuir com o desenvolvimento de ativos fotoprotetores mais seguros e eficazes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Fundamentar propostas de modificação estrutural para o planejamento de novos fotoprotetores mais eficientes e seguros, estudando por métodos teóricos o perfil de absorção UVA/UVB de uma série de derivados de benzofenonas (BFs); preparar e caracterizar complexos de inclusão e nanosistemas formados por filtros solares, octil-dimetil-PABA (ODP) e dióxido de titânio (TiO_2), intercalados em montmorilonita sódica (MMT-Na); e investigar as mudanças de propriedades dos compostos de intercalação, avaliando o potencial fotoprotetor e genotóxico em modelo de levedura (*S. cerevisiae*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar cálculos empregando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e a Teoria do Funcional da Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) no estudo das propriedades estruturais, eletrônicas e de absorção UV de BFs.
- Comparar os resultados teóricos com dados experimentais (geométricos e espectrofotométricos) disponíveis na literatura para avaliar a capacidade preditiva dos métodos empregados.
- Estudar as relações estrutura-propriedade de absorção UVA/UVB de uma série de BFs visando o planejamento racional de novos fotoprotetores com eficácia aprimorada, ou seja, absorção UVA/UVB de alta intensidade.
- Preparar os novos materiais utilizando a química de intercalação e caracterizar por difração de raios X (DRX), espectrometria no infravermelho (IV-TF), análise termogravimétrica (ATG) e por calorimetria exploratória diferencial (CSD), e análise de tamanho de partículas por difração de laser (LD).
- Avaliar a atividade fotoprotetora dos materiais obtidos em relação aos efeitos letais e mutagênicos causados pela radiação UVB em modelo de levedura (*S. cerevisiae*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Matérias-primas e reagentes

- Ácido Acético P.A. Glacial (VETEC Química Fina)
- Álcool Etílico 95% P.A. (VETEC Química Fina)
- Diclorometano (Tedia Company)
- Dióxido de titânio $\geq 99\%$, anatase (Sigma)
- Montmorilonita sódica (Bentec)
- Octil-dimetil-PABA (Escalol 507, ISP Technologies)
- Polisorbato 80 (Tween 80, Sigma)

4.1.2. Equipamentos

- Balança analítica (AG 204, METTLER TOLEDO)
- Calorímetro de varredura diferencial (DSC- 60, Shimadzu)
- Análisor térmico (TGA-50, Shimadzu)
- Centrífuga (5430 R, Eppendorf)
- Difratorômetro de raios X (DMAX 2200, Rigaku)
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (IR Prestige- 21, Shimadzu)
- Espectrofotômetro UV/Vis (Lambda 25, PerkinElmer)
- Placa de agitação e aquecimento (Stimer/ Hot Plate, Hielscher)
- Processador ultra-sônico (UP100H, Hielscher)
- Analisador de tamanho de partícula (Mastersizer 2000, Malvern)

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Estudo das propriedades estruturais, eletrônicas e de absorção UV de derivados da benzofenona

4.2.1.1. Banco de dados: série de derivados da benzofenona

Para avaliação do efeito dos substituintes no espectro de absorção da BF, construiu-se um banco de dados com derivados da BF aprovados para o uso em protetores solares pela ANVISA ou que possuem substituintes semelhantes àqueles aprovados (ANVISA, 2006).

Além de BFs semelhantes aos filtros BF-3 (Figura 6) e BF-8, foram incluídos também derivados que possuem substituintes semelhantes ao DHHB (Figura 7).

Na Tabela 3, estão listados os derivados de BF empregados no estudo.

Tabela 3. Série de derivados da BF utilizada no estudo.

| Substância | Código |
|--|------------------------------|
| benzofenona | BF |
| 2-hidroxibenzofenona | 2-OHBF |
| 4-hidroxibenzofenona | 4-OHBF |
| 2,2'-dihidroxibenzofenona | 2,2'-OHBF |
| 2,4-dihidroxibenzofenona | 2,4-OHBF |
| 4,4'-dihidroxibenzofenona | 4,4'-OHBF |
| 2,4,4'- trihidroxibenzofenona | 2,4,4'-OHBF |
| 2,2',4,4'- tetrahidroxibenzofenona | 2,2',4,4'-OHBF |
| 4-metoxibenzofenona | 4-OMeBF |
| 4,4'-dimetoxibenzofenona | 4,4'-OMeBF |
| 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BF-3) | 2-OH, 4-OMeBF |
| 2,2'-dihidroxi-4- metoxibenzofenona (BF-8) | 2,2'-OH, 4-OMeBF |
| 2,2'-hidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona | 2,2'-OH, 4,4-OMeBF |
| 4-etoxibenzofenona | 4-OEtBF |
| 4,4'-dietoxibenzofenona | 4,4'-OEtBF |
| 2-hidroxi-4-etoxifenzofenona | 2-OH, 4-OEtBF |
| 2-aminobenzofenona | 2-NH ₂ BF |
| 4-aminobenzofenona | 4-NH ₂ BF |
| 4,4'-diaminobenzofenona | 4,4'-NH ₂ BF |
| 2-hidroxi-4-aminobenzofenona | 2-OH, 4-NH ₂ BF |
| 4-dimetilaminobenzofenona | 4-N(Me) ₂ BF |
| 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona | 4,4'-N(Me) ₂ BF |
| 2-hidroxi-4-dimetilaminobenzofenona | 2-OH,4-N(Me) ₂ BF |
| 4-dietilaminobenzofenona | 4-N(Et) ₂ BF |
| 4,4'-bis(dietilamino)benzofenona | 4,4'-N(Et) ₂ BF |
| 2-hidroxi-4-dietilaminobenzofenona | 2-OH,4-N(Et) ₂ BF |
| 2-carboxibenzofenona | 2-COOH-BF |
| 2-(metoxicarbonil)-benzofenona | 2-COOMet-BF |
| 2-(etoxicarbonil)-benzofenona | 2-COOEt-BF |

4.2.1.2. Cálculos das propriedades estruturais

4.2.1.2.1. Análise conformacional

As estruturas moleculares dos derivados de benzofenona foram otimizadas utilizando o programa Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, California, USA).

Inicialmente, foi realizado o desenho e a minimização de energia da estruturas 3D de cada um dos compostos da série.

Para a determinação da superfície de energia potencial mínima no vácuo realizou-se uma busca sistemática pelo método de mecânica molecular, utilizando o campo de forças *Merck Molecular Force Field* (MMFF) disponível no programa Spartan'10. As energias das estruturas moleculares foram calculadas em função dos principais ângulos de diedros usando incrementos de 120°. A conformação de menor energia para cada derivado foi selecionada para as análises subsequentes.

4.2.1.2.2. Otimização geométrica

Com o objetivo de estabelecer o método mais adequado para a otimização geométrica, cálculos preliminares foram realizados com o confômero de menor energia do derivado 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BF-3), utilizando os seguintes cálculos mecânico-quânticos: semi-empíricos RM1 e PM6, DFT/B3LYP (LEE & YANG & PARR, 1988; MIEHLICH *et al.*, 1989; BECKE, 1993) e *ab initio* HF. Para os métodos DFT/B3LYP e HF, utilizaram-se diferentes funções de base. O método com maior eficiência para o cálculo das propriedades estruturais foi então empregado para a otimização geométrica dos confômeros de menor energia dos demais derivados em estudo.

Tanto para a determinação do método, quanto para a validação do mesmo, as estruturas otimizadas foram comparadas com as respectivas estruturas obtidas por difração de raios X, disponíveis no banco de dados

Cambridge (CSD, do inglês *Cambridge Structural Database*, Cambridge, UK). As benzofenonas de interesse disponíveis no CSD estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Lista de códigos e respectivas referências das estruturas disponíveis no banco de dados CSD.

| substância | código CSD | referência |
|-----------------------------------|------------|----------------------------------|
| benzofenona | BPHENO03 | (KUTZKE <i>et al.</i> , 2000) |
| 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona | HMXBZP | (LIEBICH & PARTHE, 1974) |
| 2-hidroxibenzofenona | KEFRAP | (SARASWAT <i>et al.</i> , 2006) |
| 4-hidroxibenzofenona | YAJPUV | (KOOIJMAN <i>et al.</i> , 2005) |
| 2,4-dihidroxibenzofenona | DHXBZP10 | (LIEBICH, 1979) |
| 4,4'-dihidroxibenzofenona | TICFUG | (FERGUSON & GLIDEWELL, 1996) |
| 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona | BADVIL10 | (SCHLEMPER, 1982) |
| 4,4'-diaminobenzofenona | AMBZPH | (VAN DER VELDEN & NOORDIK, 1980) |
| 4-metoxibenzofenona | TAPVAH | (GUO <i>et al.</i> , 1992) |
| 4,4'-dietoxibenzofenona | WIDTUY | (KUS & JONES, 2000) |

4.2.1.3. Cálculos das propriedades eletrônicas e de absorção UV

As coordenadas internas foram utilizadas como dados de entrada para o estudo das propriedades eletrônicas e de absorção UV usando o método TD-DFT/B3LYP no vácuo disponível no programa GAMESS US (SCHMIDT *et al.*, 1993; LASINSKI *et al.*, 2008). As 10 excitações singleto-singleto de menor energia foram calculadas com seus respectivos comprimentos de onda, energias de transição, configurações de transição e forças de oscilação.

Foi realizada a comparação dos comprimentos de onda máximos de absorção calculados no presente estudo com dados obtidos experimentalmente

através da análise em espectrofotômetro de absorção UV ou a partir de resultados de outros trabalhos disponíveis na literatura.

Visando estudos de relação estrutura-propriedade, os cálculos das propriedades eletrônicas e de absorção UV foram realizados em uma série de derivados da benzofenona (Tabela 3) aprovados ou com substituintes similares àqueles aprovados na lista de filtros UV permitidos pela ANVISA para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes (ANVISA, 2006).

4.2.1.4. *Espectro de absorção UV da benzofenona-3*

O espectro de absorção UV do derivado 2-hidróxi-4-metóxi-benzofenona (BF-3) foi analisado em espectrofotômetro UV/Vis (JASCO V-630) à temperatura ambiente (24 °C). O espectro de absorção na faixa de 270-400 nm foi medido em uma solução de 20 µg/mL de BF-3 (Aldrich, 98% de pureza) em diclorometano (Sigma-Aldrich, ≥ 99,8% de pureza). Utilizou-se o solvente diclorometano com o branco para a calibração do equipamento.

4.2.2. Preparação dos complexos de inclusão formados por MMT-Na e ODP

Realizou-se o ensaio de intercalação do ODP em MMT-Na em triplicata, tomando-se como base os resultados descritos por Soares (2003) e Coelho e col. (2008).

Os complexos de inclusão foram preparados com a MMT-Na pré-intumescida em água destilada (1g/50 mL) por 24 h, à temperatura ambiente, sob agitação magnética.

Inicialmente, foi realizado o inchamento da argila (pré-intumescimento) para facilitar a intercalação do filtro no espaço interlamelar. Com a penetração da água entre as lamelas, ocorre o aumento do espaçamento basal facilitando a entrada da molécula hóspede.

As reações de inclusão foram realizadas com 1 g de MMT-Na e 280 mg de ODP, que equivale a aproximadamente 100 mmol de ODP/100 g de MMT-Na, ou seja a 100% da CTC da argila em questão.

O filtro solar ODP foi previamente solubilizado em ácido acético puro e, depois, a solução de ODP foi adicionada à argila pré-intumescida em água destilada. O volume total da mistura de solventes (água e ácido acético) utilizado foi de 200 mL.

O sistema foi mantido sob agitação constante durante 1 hora, para que pudesse ocorrer a intercalação do filtro. Após o término do tempo reacional, o sistema foi centrifugado a 4.000 r.p.m., por 1 h e o sedimento foi recolhido e seco à temperatura ambiente. Os materiais obtidos foram triturados e calibrados em tamis de malha 70 mesh (tamanho padronizado pela ABNT) para posterior caracterização por meios de análises térmicas (DSC e TGA), IV-TF, DRX e DLS.

O sobrenadante foi utilizado para o cálculo do rendimento indireto da reação. Realizou-se a transferência quantitativa do material para um balão volumétrico de 200 mL, avolumando-se com etanol.

4.2.2.1. *Rendimento da intercalação*

O rendimento da intercalação foi calculado de maneira indireta, com a diluição do sobrenadante e leitura por espectrofotometria UV-Vis em 311 nm, utilizando-se como solvente, para as diluições e leitura, o etanol.

O cálculo do rendimento foi realizado com base na curva padrão preparada a partir da leitura da absorbância de soluções com diferentes concentrações de ODP em etanol.

4.2.2.1.1. Construção da curva padrão

Foram preparadas soluções de ODP em etanol nas concentrações de 0,3 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1,6 µg/mL, 2,5 µg/mL, 3,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 6,0 µg/mL, 7,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 12,0 µg/mL, 14,0

$\mu\text{g/mL}$ e $16,0 \mu\text{g/mL}$ de ODP. A curva padrão foi obtida através da leitura da absorbância das soluções em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda fixo de 311 nm.

4.2.3. Preparação de nanosistemas formados por MMT-Na e TiO_2

Em 200 mL de água destilada, realizou-se a dispersão de 1 g de dióxido de titânio e 1 g de montmorilonita sódica. A suspensão foi submetida à sonicação por 45 min na potência de 60 W. Depois, o material foi liofilizado e conduzido para caracterização por DRX, IV-TF, DSC, TGA e DLS.

4.2.4. Caracterização dos materiais formados

4.2.4.1.1. Difração de raios X (DRX)

As amostras pulverizadas e calibradas em tamis de malha 70 (ABNT) foram analisadas em Difratorômetro de raios X operado a 30 kV, 15 mA, 0,05 mm, 1°C/min , em temperatura ambiente. Utilizou-se radiação $\text{CuK}\alpha$ como fonte de raios X (comprimento de onda de 0,15418 nm). O ângulo de difração (2θ) foi registrado em temperatura ambiente no intervalo entre 2° a 20° para os complexos de inclusão e entre 2° a 60° para os nanosistemas.

O espaçamento interlamelar da MMT foi calculado através da aplicação da Lei de Bragg, representada pela Equação 3.

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$

Equação 3

Na equação 3, d é a distância entre os planos lamelares da argila (espaçamento interlamelar, Å), λ equivale ao comprimento de onda dos raios X é difratado (1,5418 Å) e o valor de θ é a metade do ângulo de espalhamento referente ao pico d_{001} (KOO, 2006).

4.2.4.1.2. Análise em infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

Para as análises de IV foram preparadas pastilhas de KBr com os materiais a serem analisados na concentração de 2%. Os espectros foram obtidos na região de 4000 à 400 cm^{-1} utilizando o espectrofotômetro IR PRESTIGE-21, SHIMADZU.

4.2.4.1.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foi utilizado o aparelho DSC 60, SHIMADZU, para obtenção das curvas de DSC das amostras selecionadas. Cerca de 2,0 mg de cada amostra foram pesados em cadinho de alumínio que, em seguida, foi parcialmente fechado. A taxa de aquecimento utilizada foi de 15 °C/minuto numa faixa de temperatura entre 25 – 500 °C, sob uma atmosfera de nitrogênio de 50 mL/minuto.

4.2.4.1.4. Análise termogravimétrica (ATG)

Cerca de 5,0 mg das amostras selecionadas foram corridas contra um padrão de alumina num fluxo de nitrogênio de 50 mL/minuto na faixa de temperatura entre 50 e 700 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/minuto. O Analisador Termogravimétrico TGA-50, SHIMADZU, foi utilizado para realização das análises. Para construção dos gráficos, calculou-se o percentual de perda de massa.

4.2.4.1.5. Análise de tamanho de partículas por difração de laser (LD)

A determinação da distribuição do tamanho de partícula foi realizada em analisador de tamanho de partícula (Mastersizer 2000, Malvern), módulo úmido. Em análises prévias, observou-se aglomeração do material obtido. Por

isso, antes da análise, realizou-se a dispersão do material em água destilada e a dispersão foi submetida à sonicação (60W) por 5 minutos. Depois, para reduzir a tensão interfacial sólido/líquido e conseqüentemente os aglomerados, adicionou-se 0,02% de Tween 80.

4.2.5. Avaliação do potencial fotoprotetor em leveduras

Avaliou-se o potencial fotoprotetor dos materiais desenvolvidos neste trabalho em colaboração com aluna de mestrado Juliana Patrão de Paiva do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ no Laboratório de Radiobiologia Molecular, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

Nos experimentos, a cepa CD138 (deficiente no gene *ogg1*) de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada. Em leveduras e células de mamíferos, o gene *ogg1* participa na remoção de guaninas oxidadas prevenindo o aumento da mutagênese nestas células (PINTO *et al.*, 2010). A oxidação da guanina para 8-oxoguanina (oxoG) no DNA é uma transformação frequente, que ocorre em células como resultado do estresse oxidativo (SINGH *et al.*, 2011). Cepas de leveduras deficientes no gene *ogg1* (CD138) apresentam um aumento na taxa de mutação (PINTO *et al.*, 2010) e são naturalmente sensíveis a danos oxidativos oxidativo (SINGH *et al.*, 2011).

As leveduras foram cultivadas em meio YPG líquido (Extrato de levedura 1% (Difco), Peptona 1% (Difco), Glicose 2% (Merck)) por 48 horas, a 30°C com agitação, até atingir a concentração de $\sim 1 \times 10^8$ células/mL. Com a cultura em fase estacionária, as células foram centrifugadas a 7000 rpm/10min, lavadas uma vez, ressuspensas em água bidestilada autoclavada e diluídas a 10^7 células/mL (SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2010).

As leveduras foram expostas a doses crescentes de UV-B, em placas de petri de vidro (5 cm de diâmetro) com um volume final de 10 mL de água bidestilada autoclavada contendo 1×10^7 células/mL e 100 µg/mL do material a ser testado. A irradiação foi feita com uma lâmpada Vilbert Lourmat Ultravioleta (duplo comprimento de onda 312/365 nm, 15 watts) e as doses foram

determinadas com radiômetro Mod. VL – 215 LM de amplo espectro. O comprimento de onda utilizado para a irradiação foi de 312 nm, nas doses de 5; 10; 15, 20, 25 e 30 kJ/m². Após cada dose, alíquotas foram retiradas para determinação da sobrevivência celular. Foram feitas diluições seriadas as quais foram plaqueadas em duplicata em meio YPG sólido (com 2% ágar) a 30 °C. As colônias foram contadas depois de um período de aproximadamente 96 h. Todos os experimentos de sobrevivência foram realizados de forma independente, pelo menos, três vezes (SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2010).

Para analisar a mutagênese foi utilizado o sistema de resistência a canavanina. É um sistema que detecta todas as mutações que inativam o gene da arginina permease, *CAN1*, que permite a entrada da arginina para o uso da célula. Ocorre a incorporação da canavanina e inativação celular quando houver altas concentrações de canavanina no meio de cultivo. Porém, as células que possuem o gene *CAN1* não funcionando irão sobreviver, pois não utilizarão a canavanina da placa. Este sistema de seleção é possível, uma vez que as cepas utilizadas em no trabalho são prototróficas para arginina (SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2010).

Depois do tratamento das células, a quantificação dos mutantes induzidos pela radiação UV associada ao material testado foi realizada por meio do plaqueamento de diluições apropriadas em meio seletivo YNBD (com 60 mg/ml de sulfato de canavanina (Sigma) para o crescimento seletivo dos mutantes resistentes). As colônias foram contadas após 4 dias a 30 °C para determinação dos mutantes resistentes a canavanina. Todos os experimentos foram conduzidos independentemente por pelo menos três vezes, e todas as frequências de mutação foram determinadas e expressas como a média com seus respectivos desvios padrões (SOUZA, 2009; PINTO *et al.*, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS, ELETRÔNICAS E DE ABSORÇÃO UV DE DERIVADOS DA BENZOFENONA

Os resultados apresentados nesta parte da tese foram publicados no seguinte artigo: CORRÊA, B. A.; GONCALVES, A. S.; DE SOUZA, A. M. et al. Molecular modeling studies of the structural, electronic, and UV absorption properties of benzophenone derivatives. **J Phys Chem A**, v. 116, n. 45, p. 10927-33, Nov 15 2012 (ANEXO I).

5.1.1. Estudo das propriedades estruturais de derivados da benzofenona

Cálculos preliminares foram realizados com o confômero de menor energia da BF-3 utilizando diferentes métodos quânticos visando determinar o método mais acurado para as otimizações geométricas.

Os parâmetros estruturais calculados e os dados cristalográficos (LIEBICH & PARTHE, 1974) estão apresentados na Tabela 5.

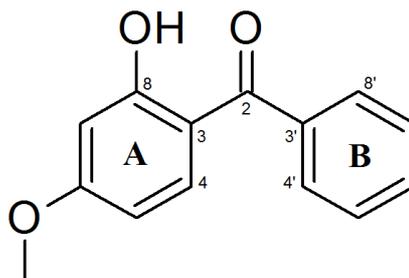
As estruturas otimizadas são mínimos locais de energia obtidos no vácuo pelos métodos semi-empíricos RM1 e PM6, *ab initio* HF e DFT/B3LYP no estado fundamental.

Foi observado que os métodos semi-empíricos e *ab initio* subestimaram o comprimento de ligação O=C(2). Maiores variações do comprimento de ligação O=C(2) foram observadas entre o dado experimental (LIEBICH & PARTHE, 1974) e os resultados de HF/6-31G(d) ou HF/6-31G(d,p) ($\Delta r_{\max} = 0,043 \text{ \AA}$ para ambos).

A ligação hidrogênio intramolecular entre o grupo hidroxila e o átomo oxigênio da carbonila influencia no comprimento de ligação O=C(2). Quanto menor a distância da ligação hidrogênio, maior o comprimento de ligação O=C(2) (COX & KECHAGIAS & KELLY, 2008). Os métodos semi-empíricos e *ab initio* apresentaram menores comprimento de ligação O=C(2) e maiores

distâncias O-H...O=C(2) do que aqueles observados na estrutura cristal e obtidos pelos métodos DFT/B3LYP (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros calculados usando diferentes métodos e dados experimentais (dados de cristalografia da raios-X; código CSD: HMXBZP (LIEBICH & PARTHE, 1974))^a



| Parâmetros | RM1 | PM6 | DFT/B3LYP | | HF | | Exp. | |
|-----------------|--------|--------|-----------|------------|-----------|----------|--------|------------|
| | | | 6-31G(d) | 6-31G(d,p) | 6-31+G(d) | 6-31G(d) | | 6-31G(d,p) |
| O=C(2) | 1,234 | 1,234 | 1,249 | 1,250 | 1,250 | 1,212 | 1,212 | 1,255 |
| C(2)-C(3) | 1,456 | 1,456 | 1,465 | 1,463 | 1,465 | 1,475 | 1,475 | 1,447 |
| C(2)-C(3') | 1,473 | 1,496 | 1,499 | 1,498 | 1,499 | 1,501 | 1,501 | 1,500 |
| O-C(2)-C(3) | 119,77 | 120,56 | 120,93 | 120,76 | 120,81 | 121,03 | 121,01 | 120,99 |
| O-C(2)-C(3') | 120,55 | 119,61 | 117,26 | 117,24 | 117,49 | 117,86 | 117,83 | 116,08 |
| C(3)-C(2)-C(3') | 119,66 | 119,83 | 121,80 | 121,99 | 121,70 | 121,11 | 121,16 | 122,93 |
| C(2)-C(3)-C(4) | 122,32 | 122,91 | 123,49 | 123,74 | 123,25 | 122,76 | 122,82 | 122,26 |
| C(2)-C(3)-C(4') | 119,68 | 120,15 | 122,86 | 122,91 | 122,59 | 122,51 | 122,50 | 121,69 |
| C(2)-C(3)-C(8) | 118,95 | 119,37 | 119,10 | 118,76 | 119,45 | 119,98 | 119,87 | 120,48 |
| C(2)-C(3)-C(8') | 119,59 | 119,43 | 117,86 | 117,80 | 118,07 | 117,97 | 117,95 | 118,41 |
| O-H...O=C(2) | 1,697 | 1,683 | 1,658 | 1,625 | 1,676 | 1,802 | 1,795 | 1,575 |

^a Os comprimentos de ligação estão em Å e os ângulos de ligação em ° (graus).

Os comprimentos de ligação calculados pelo método DFT/B3LYP com as funções de base 6-31G(d), 6-31G(d,p) and 6-31+G(d) estão de acordo com

os resultados obtidos experimentalmente (LIEBICH & PARTHE, 1974) ($\Delta r_{\max} < 0,02 \text{ \AA}$). A Figura 12 apresenta a diferença percentual de valor (DPV) entre os parâmetros calculados por DFT/B3LYP nas diferentes funções de base 6-31G(d), 6-31G(d,p) and 6-31+G(d) e os dados da estrutura cristalográfica (LIEBICH & PARTHE, 1974). Pode-se observar que todos os valores DPV são inferiores a 2,0%. Avaliando a acurácia e velocidade computacional (JACQUEMIN *et al.*, 2009) e levando em consideração o princípio da parcimônia, o método DFT/B3LYP/6-31G(d) foi selecionado para os cálculos seguintes.

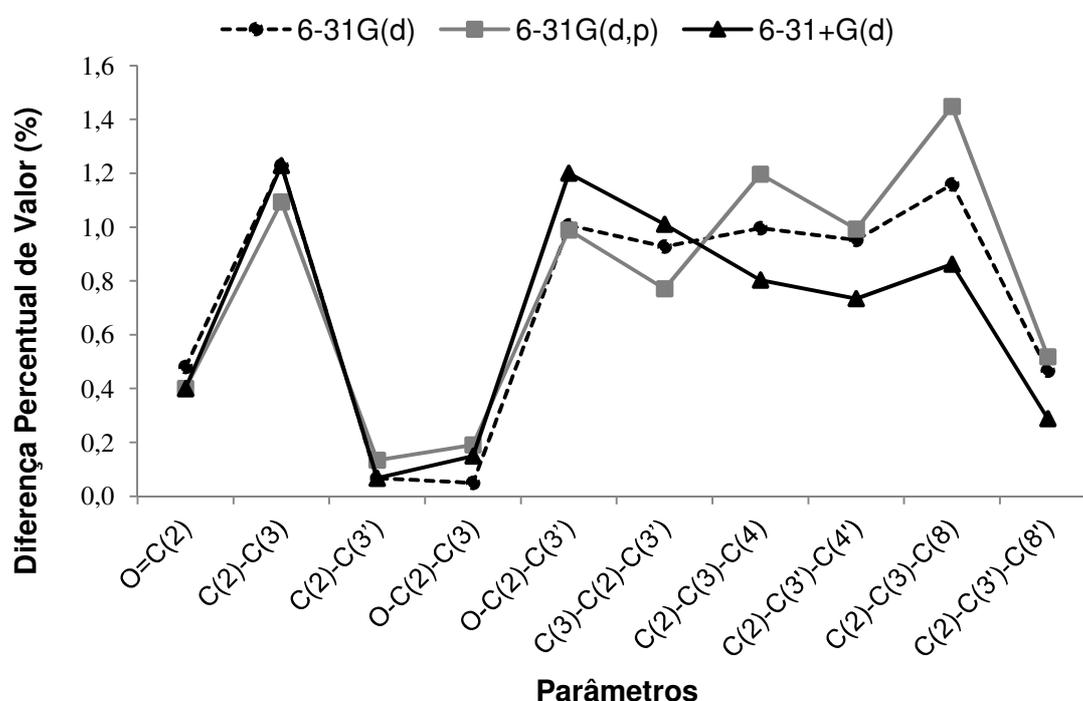


Figura 12. Diferença percentual de valor entre a geometria calculada (DFT/B3LYP) e a estrutura cristal (dados de cristalografia da raios-X; código CSD: HMXBZP (LIEBICH & PARTHE, 1974)).

Adicionalmente, outras estruturas otimizadas pelo método selecionado foram comparadas com a estrutura cristal disponível no CSD (LIEBICH & PARTHE, 1974; LIEBICH, 1979; VAN DER VELDEN & NOORDIK, 1980; SCHLEMPER, 1982; GUO *et al.*, 1992; FERGUSON & GLIDEWELL, 1996; KUS & JONES, 2000; KUTZKE *et al.*, 2000; KOOIJMAN *et al.*, 2005; SARASWAT *et al.*, 2006). Na Tabela 6, estão listados os parâmetros

estruturais calculados pelo método DFT/B3LYP/6-31G(d) e aqueles obtidos experimentalmente estão listados com seus respectivos valores DPV.

Todos os valores DPV são menores ou próximos a 2,0%, demonstrando que o método selecionado fornece resultados satisfatórios para as otimizações dos derivados em estudo.

Tabela 6. Parâmetros estruturais das benzofenonas calculadas por DFT/B3LYP/6-31G(d) e os dados experimentais (cristalografia de raios-X).

| subst-BZP (cod. CSD) | método | O=C(2) | C(2)-C(3) | C(2)-C(3') | O-C(2)-C(3) | O-C(2)-C(3') | C(3)-C(2)-C(3') | C(2)-C(3)-C(4) | C(2)-C(3')-C(4') | C(2)-C(3)-C(8) | C(2)-C(3')-C(8') |
|----------------------------------|--------|--------|-----------|------------|-------------|--------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| nenhum (BPHENO03) | DFT | 1,227 | 1,501 | 1,501 | 119,6 | 119,6 | 120,8 | 123,2 | 123,2 | 117,6 | 117,6 |
| | Exp. | 1,223 | 1,486 | 1,496 | 121,1 | 120,1 | 118,9 | 121,1 | 120,7 | 120,1 | 119,7 |
| | DPV | 0,3 | 1,0 | 0,3 | 1,2 | 0,4 | 1,6 | 1,7 | 2,0 | 2,1 | 1,8 |
| 2-OH (KEFRAP) | DFT | 1,246 | 1,474 | 1,498 | 120,6 | 117,5 | 121,9 | 122,9 | 122,9 | 118,9 | 117,8 |
| | Exp. | 1,240 | 1,463 | 1,487 | 121,0 | 117,7 | 121,3 | 122,1 | 122,8 | 119,9 | 117,3 |
| | DPV | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,6 | 0,1 | 0,8 | 0,4 |
| 4-OH (YAJPUV) | DFT | 1,228 | 1,494 | 1,503 | 120,0 | 119,3 | 120,7 | 123,8 | 123,2 | 117,8 | 117,7 |
| | Exp. | 1,245 | 1,459 | 1,487 | 119,3 | 118,5 | 122,2 | 123,6 | 122,8 | 119,2 | 118,6 |
| | DPV | 1,4 | 2,3 | 1,1 | 0,6 | 0,7 | 1,2 | 0,1 | 0,3 | 1,2 | 0,8 |
| 2,4-OH (DHXBZP10) | DFT | 1,249 | 1,465 | 1,499 | 120,9 | 117,2 | 121,9 | 123,4 | 122,9 | 119,0 | 117,8 |
| | Exp. | 1,253 | 1,453 | 1,490 | 120,4 | 117,5 | 122,1 | 122,3 | 122,3 | 120,3 | 117,7 |
| | DPV | 0,3 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,9 | 0,5 | 1,1 | 0,1 |
| 4,4-OH (TICFUG) | DFT | 1,230 | 1,496 | 1,496 | 119,6 | 119,6 | 120,8 | 123,9 | 123,9 | 117,7 | 117,7 |
| | Exp. | 1,250 | 1,477 | 1,485 | 119,3 | 117,6 | 123,1 | 122,1 | 121,5 | 117,8 | 118,3 |
| | DPV | 1,6 | 1,3 | 0,7 | 0,3 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 1,9 | 0,1 | 0,5 |
| 2,2',4,4'-OH (BADVIL10) | DFT | 1,269 | 1,468 | 1,468 | 118,4 | 118,4 | 123,3 | 123,4 | 123,4 | 119,2 | 119,2 |
| | Exp. | 1,269 | 1,455 | 1,451 | 117,7 | 118,7 | 123,6 | 121,8 | 123,5 | 121,4 | 120,2 |
| | DPV | 0,0 | 0,9 | 1,2 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 1,4 | 0,0 | 1,8 | 0,8 |
| 4,4'-NH ₂ (AMBZPH) | DFT | 1,232 | 1,494 | 1,493 | 119,5 | 119,6 | 120,8 | 124,1 | 124,1 | 117,9 | 117,9 |
| | Exp. | 1,240 | 1,474 | 1,482 | 120,8 | 119,7 | 119,5 | 122,7 | 121,4 | 120,0 | 120,6 |
| | DPV | 0,6 | 1,3 | 0,7 | 1,1 | 0,1 | 1,1 | 1,1 | 2,2 | 1,8 | 2,3 |
| 4-OMe (TAPVAH) | DFT | 1,229 | 1,485 | 1,485 | 119,1 | 119,2 | 121,6 | 121,9 | 121,7 | 118,5 | 118,4 |
| | Exp. | 1,220 | 1,492 | 1,487 | 119,3 | 119,8 | 120,9 | 123,0 | 122,3 | 118,5 | 118,6 |
| | DPV | 0,7 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,6 | 0,9 | 0,5 | 0,0 | 0,2 |
| 4,4'-EtO (WIDTUY) | DFT | 1,229 | 1,495 | 1,497 | 119,7 | 119,7 | 120,6 | 123,5 | 123,8 | 118,2 | 117,9 |
| | Exp. | 1,226 | 1,493 | 1,493 | 119,9 | 119,9 | 120,2 | 122,9 | 122,9 | 118,6 | 118,6 |
| | DPV | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | 0,6 |

5.1.2. Determinação da capacidade de predição do espectro de absorção UV de derivados da benzofenona

Para determinação da capacidade de predição do espectro de absorção UVA/UVB, cálculos TD-DFT foram realizados na estrutura otimizada da BF-3 na mesma função de base usada para as otimizações. Os resultados foram comparados com o espectro de absorção medidos experimentalmente em diclorometano (20 µg/mL de BF-3) (Figura 13).

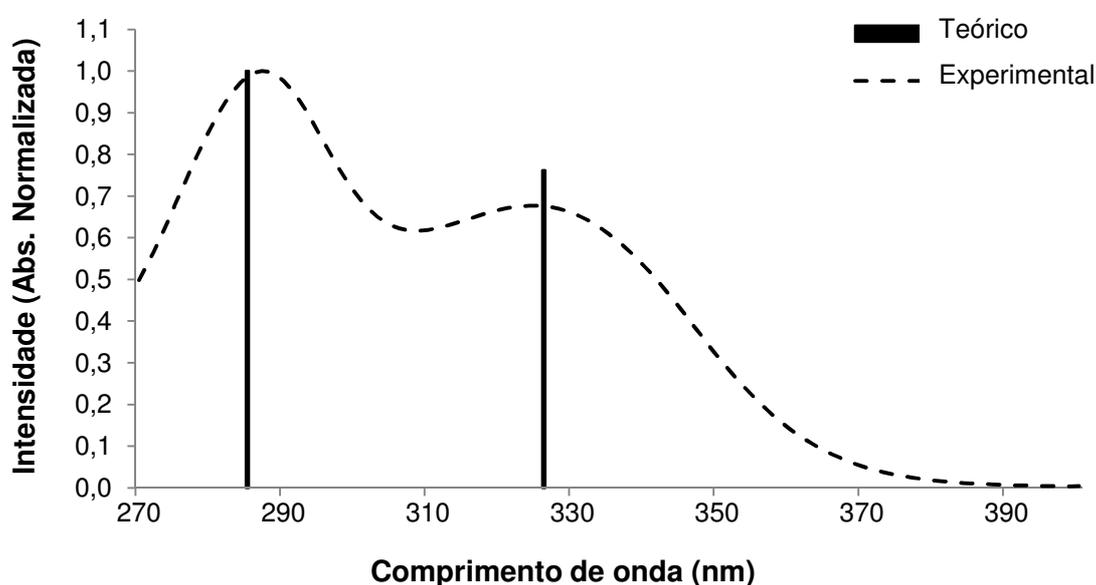


Figura 13. Comparação do espectro de absorção UV teórico (método TD-DFT/B3LYP/6-31G(d) no vácuo) e experimental (diclorometano). A normalização da absorbância foi realizada de acordo com a intensidade máxima de cada espectro.

As bandas de absorção medidas experimentalmente em 287 e 325 nm foram calculadas no vácuo em 285 e 326 nm. Estudos anteriores indicam que o espectro de absorção da BF-3 não é muito afetado pela presença de solvente (BAUGHMAN *et al.*, 2009). No entanto, outras benzofenonas podem apresentar deslocamentos solvatocrômicos na presença de solventes de diferentes polaridades (DILLING, 1966; BAUGHMAN *et al.*, 2009). Apesar do efeito solvatocrômico ser importante para simulações quantitativas, cálculos do

espectro de absorção no vácuo podem fornecer dados qualitativos importantes (JACQUEMIN *et al.*, 2009).

Desta forma, visando estudos das relações estrutura-propriedade (SPR, do inglês *structure-property relationships*), cálculos TDDFT/B3LYP/6-31G(d) foram realizados no vácuo utilizando a estrutura otimizada pelo método DFT/B3LYP/6-31G(d) de uma série de derivados da benzofenona aprovados ou com substituintes similares àqueles aprovados na lista de filtros UV permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA, 2006)

Na Tabela 7 estão listados os comprimentos de onda mais relevantes ($\lambda > 280$ nm), energias de transição, forças de oscilação ($f > 0.1$) e principais configurações de transição para cada derivado em estudo.

Tabela 7. Transições (comprimento de onda – nm e energia - eV), força de oscilação (f) ($f > 0.1$) e composição em termos de orbitais moleculares (MO) calculadas para as benzofenonas.

| subst-BF | λ /nm | eV | MO | f |
|---------------------------|----------------------|-------|---|--------------------|
| 2-OH | 340 | 3,651 | HOMO → LUMO: 0,92 | 0,104 |
| 4-OH | 283 | 4,375 | HOMO → LUMO: 0,78 | 0,280 |
| 2,2'-OH | 364 | 3,409 | HOMO → LUMO: 0,94 | 0,181 |
| 2,4-OH | 281 | 4,407 | HOMO-3 → LUMO: -0,85 | 0,226 |
| | 323 | 3,847 | HOMO → LUMO: 0,83 | 0,144 |
| 4,4'-OH | 287 | 4,323 | HOMO-1 → LUMO: 0,94 | 0,412 |
| | 289 | 4,291 | HOMO-1 → LUMO: 0,63 HOMO-2 → LUMO: -0,59 | 0,210 |
| 2,2',4,4'-OH | 367 | 3,383 | HOMO → LUMO: -0,83 | 0,228 |
| | 295 | 4,210 | HOMO-2 → LUMO: -0,93 | 0,167 |
| 4-OMe | 346 | 3,588 | HOMO → LUMO: 0,92 | 0,348 |
| | 291 | 4,271 | HOMO → LUMO: 0,81 | 0,291 |
| 4,4'-OMe | 283 | 4,387 | HOMO-1 → LUMO: -0,95 | 0,425 |
| | 285 | 4,358 | HOMO-1 → LUMO: -0,86 | 0,235 |
| 2-OH, 4-OMe | 326 | 3,812 | HOMO → LUMO: 0,87 | 0,179 |
| | 296 | 4,188 | HOMO-2 → LUMO: 0,84 | 0,186 |
| 2,2'-OH, 4-OMe | 356 | 3,486 | HOMO → LUMO: -0,92 | 0,263 |
| | 297 | 4,181 | HOMO-2 → LUMO: -0,94 | 0,188 |
| 2,2'-OH, 4,4-OMe | 351 | 3,536 | HOMO → LUMO: -0,93 | 0,436 |
| | 4-OEt | 283 | 4,376 | HOMO → LUMO: 0,76 |
| 4,4'-OEt | 293 | 4,239 | HOMO-1 → LUMO: 0,94 | 0,511 |
| | 286 | 4,341 | HOMO-1 → LUMO: 0,87 | 0,244 |
| 2-OH, 4-OEt | 326 | 3,803 | HOMO → LUMO: 0,87 | 0,186 |
| | 2-NH ₂ | 361 | 3,431 | HOMO → LUMO: -0,92 |
| 4-NH ₂ | 304 | 4,082 | HOMO → LUMO: -0,86 | 0,272 |
| | 4,4'-NH ₂ | 307 | 4,043 | HOMO → LUMO: -0,93 |
| 2-OH, 4-NH ₂ | 297 | 4,175 | HOMO-1 → LUMO: -0,77 | 0,118 |
| | 310 | 3,997 | HOMO → LUMO: -0,70 | 0,199 |
| 4-N(Me) ₂ | 311 | 3,990 | HOMO → LUMO: -0,84 | 0,250 |
| 4,4'-N(Me) ₂ | 307 | 4,043 | HOMO → LUMO: 0,95 | 0,496 |
| 2-OH,4-N(Me) ₂ | 322 | 3,855 | HOMO → LUMO: -0,87 | 0,366 |
| 4-N(Et) ₂ | 323 | 3,839 | HOMO → LUMO: 0,76 | 0,237 |
| 4,4'-N(Et) ₂ | 335 | 3,710 | HOMO → LUMO: 0,95 | 0,712 |
| 2-OH,4-N(Et) ₂ | 325 | 3,814 | HOMO → LUMO: 0,91 | 0,414 |

Para confirmar a acurácia dos cálculos TD-DFT no vácuo, realizou-se a comparação dos espectros calculados com dados experimentais disponíveis na literatura (Figura 14) (DILLING, 1966; BAUGHMAN *et al.*, 2009).

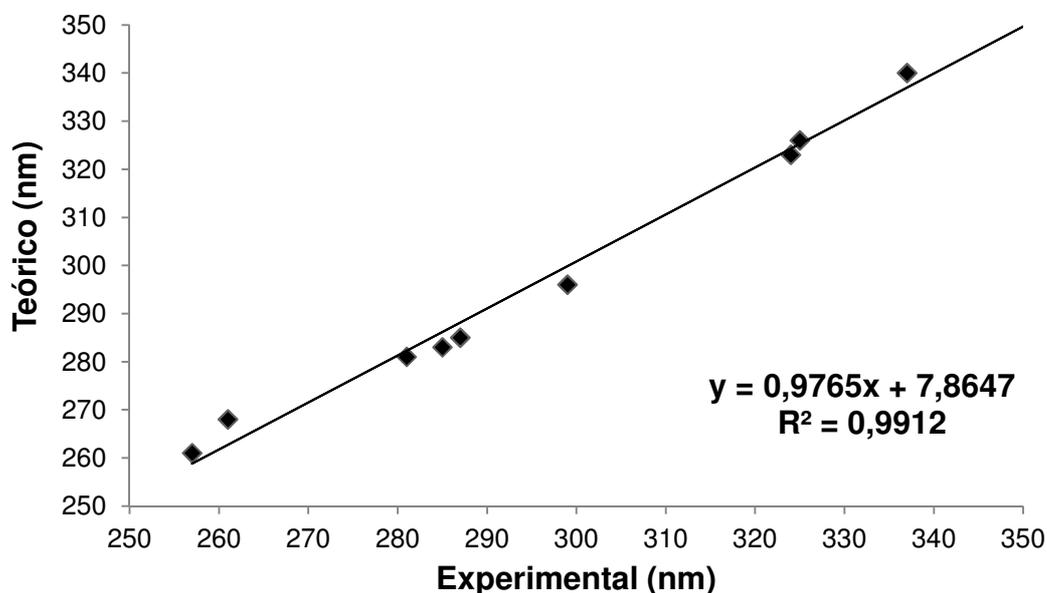


Figura 14. Comparação dos comprimentos de onda (nm) de absorção máxima teórica e experimental.

A benzofenona não substituída apresenta uma banda experimental em 257 nm em água (DILLING, 1966) enquanto no vácuo essa banda foi calculada em 261 nm. A absorção experimental da 2,2'-hidroxi-4-metoxibenzofenona medida em 299 e 355 nm em tolueno (BAUGHMAN *et al.*, 2009) foi calculada em 296 e 356 nm no vácuo. O composto 4-hidroxibenzofenona apresenta a banda experimental em 285 nm em dietiléter (DILLING, 1966) e a absorção máxima teórica no vácuo em 283 nm. A absorção máxima experimental medida em 261 e 337 nm em etanol (DILLING, 1966) foi calculada no vácuo em 268 e 340 nm para a 2-hidroxibenzofenona. A absorção UV experimental da 2,4-hidroxibenzofenona em 281 e 324 nm (ciclohexano) (DILLING, 1966) foi calculada em 281 e 323 nm no vácuo.

Como observado na Figura 14 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, os resultados calculados para os derivados isolados estão de acordo com os dados experimentais ($R^2 = 0.9912$).

5.1.3. Estudo das relações estrutura-propriedade de absorção UV

5.1.3. Estudo das relações estrutura-propriedade de absorção UV de derivados da benzofenona

5.1.3.1. Derivados da benzofenona substituídos com oxigênio

Em uma análise geral da absorção das hidroxibenzofenonas foi observado que esses derivados exibem pelo menos um pico de absorção na faixa do UVA/UVB, sendo que os derivados 2,4-OHBF, 2,4,4'-OHBF e 2,2',4,4'-OHBF apresentam absorção em ambas as faixas UVA e UVB. Considerando a natureza dos orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas, todos esses derivados apresentam os máximos de absorção atribuídos a transições de característica $\pi \rightarrow \pi^*$ (Quadro 2).

Quadro 2. Orbitais de HOMO e LUMO das hidroxibenzofenonas.

| Subst-BF | HOMO-3 | HOMO-2 | HOMO-1 | HOMO | LUMO |
|--------------|--------|--------|--------|------|------|
| 2-OH | | | | | |
| 4-OH | | | | | |
| 2,2'-OH | | | | | |
| 2,4-OH | | | | | |
| 4,4'-OH | | | | | |
| 2,4,4'-OH | | | | | |
| 2,2',4,4'-OH | | | | | |

As transições de menor energia das monohidroxibenzofenonas (2-OHBF and 4-OHBF) são predominantemente HOMO→LUMO (Tabela 7). Essa transição corresponde a 340 nm ($f = 0.104$) para a 2-OHBF e 283 nm ($f = 0.280$) para a 4-OHBF. Considerando a distribuição dos orbitais moleculares para ambos derivados, o HOMO encontra-se localizado principalmente no anel substituído A (Quadro 2).

Além disso, a transição da 2-OHBF é acompanhada por uma mudança na densidade eletrônica nos átomos oxigênios da carbonila e hidroxila atribuída a uma transferência de próton no estado excitado (ESPT, do inglês *excited-state proton transfer*) já mencionada em outros trabalhos (DILLING, 1966; BAUGHMAN *et al.*, 2009; CORRÊA, 2010).

A adição de mais um substituinte hidroxila na posição *orto* leva a um deslocamento para o vermelho (comprimento de onda aumenta) na transição de HOMO→LUMO: 340 para 364 nm (2-OH/2,2'-OH) e 283 para 323 nm (4-OH/2,4'-OH). Essa transição (HOMO→LUMO) também é acompanhada pela mudança da densidade eletrônica nos grupos hidroxila e carbonila atribuída a ESPT. Assim, pode-se inferir que a proximidade dos grupos hidroxila e carbonila promovem transições de baixa energia. O derivado 4,4'-OHBF apresenta maior força de oscilação do que o derivado monosubstituído na posição *para* do anel aromático (Tabela 7). Nessa molécula, a transição predominante é de HOMO-1→LUMO, onde HOMO-1 está localizado em ambos os anéis devido à presença dos substituintes hidroxila (Quadro 2). Essa dissubstituição na posição *para* leva a maiores intensidades de absorção na faixa do UVB em comparação com a monosubstituição nessa posição.

A presença de substituintes hidroxilas nas posições *orto* e *para* da benzofenona (2,4-OHBF, 2,4,4'-OHBF e 2,2',4,4'-OHBF) leva a uma absorção em amplo espectro (Tabela 7). No entanto, esses compostos podem ser absorvidos através da pele humana após aplicação tópica e são capazes de mimetizar a atividade biológica de hormônios apresentando atividade estrogênica e antiandrogênica (OKEREKE & BARAT & ABDEL-RAHMAN, 1995; SUZUKI *et al.*, 2005; MOLINA-MOLINA *et al.*, 2008). A atividade desreguladora endócrina pode apresentar riscos para os seres humanos e

animais, uma característica não desejável para protetores solares (SUZUKI *et al.*, 2005).

A substituição de um grupo metoxila na posição *orto* (2-OMeBF) leva a um pico de absorção em 266nm, que está fora do intervalo desejado. Em contraste, a substituição de uma metoxila na posição *para* (4-OMeBF) resulta em um máximo de absorção na faixa do UVB em 291 nm e transição de HOMO → LUMO, como observado também para a 4-OHBF. Esta transição eletrônica envolve o anel substituído A, seu substituinte e o grupo carbonila (Tabela 7 e Quadro 3). A adição de mais um grupo metoxila na posição *para* do anel B (4,4'-OMeBF) levou a um pequeno deslocamento para o azul (comprimento de onda diminui) na região do UVB e como esperado um aumento da força de oscilação (Tabela 7).

A presença de uma hidroxila na posição *orto* leva a uma absorção adicional na região UVA da 4-OMeBF (2-OH-4-OMeBF, 2,2'-OH-4-OMeBF) e da 4,4'-OMeBF (2,2'-OH-4,4'-OMeBF), classificando esses derivados como filtros orgânicos de amplo espectro. No entanto, estudos apontam que derivados *para* metoxilados também podem ser absorvidos através da pele e sofrer biotransformação por desmetilação, formando metabólitos com atividade estrogênica (SUZUKI *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2008; MOLINA-MOLINA *et al.*, 2008).

As etoxibenzofenonas apresentam o mesmo perfil que os derivados anteriores. A substituição na posição *orto*, semelhante ao grupo metoxila, não resulta em absorção na faixa desejável do espectro UV (~290 a 400 nm). A substituição na posição *para* está relacionada com a absorção UVB assim como a hidroxilação do derivado 4-OEtBF (2-OH-4-OEtBF) também amplia o espectro de absorção, mas com baixa força de oscilação (Quadro 3).

Considerando todos os derivados da benzofenona substituídos com átomos de oxigênio, o derivado 4,4'-OEtBF exibe maior força de oscilação ($f = 0.511$) com o λ_{max} calculado em 294 nm e transições de HOMO-1 → LUMO envolvendo a densidade eletrônica do átomo de oxigênio do grupo etoxila e de ambos os anéis (Quadro 3 e Tabela 7).

Quadro 3. Orbitais HOMO e LUMO das metoxi e etoxibenzenonas.

| Subst-BF | HOMO-3 | HOMO-2 | HOMO-1 | HOMO | LUMO |
|-------------------|--------|--------|--------|------|------|
| 4-OMe | | | | | |
| 4,4'-OMe | | | | | |
| 2-OH, 4-OMe | | | | | |
| 2,2'-OH, 4-OMe | | | | | |
| 2,2'-OH, 4,4'-OMe | | | | | |
| 4-EtO | | | | | |
| 4,4'-EtO | | | | | |
| 2-OH, 4-EtO | | | | | |

5.1.3.2. Aminobenzofenonas

Numa análise global das aminobenzofenonas, pode-se inferir que a presença dos grupos OH e NH na posição *orto* é acompanhada por uma mudança na densidade eletrônica do substituinte e o átomo de oxigênio da carbonila que sustenta um ESPT e tautomerismo ceto-enol/amina/imina. Comparações entre OH/NH e substituintes O-alkil/N-alkil na posição *orto* confirmam que a baixa energia necessária para ocorrer uma absorção na faixa do UVA é relacionada com a transferência de próton. O λ_{max} calculado para 2-N(Me)₂BF e 2-N(Et)₂BF está fora da faixa desejada ($\lambda_{\text{max}} < 260$ nm). O mesmo foi observado para o grupos alcóxila na posição *orto*, como já reportado no presente estudo.

No caso das benzofenonas amino-substituídas na posição *para*, a dissubstituição aumenta a força de oscilação semelhante às benzofenonas hidroxil-substituídas (Tabela 7). Além disso, a hidroxilação na posição *orto* amplia o espectro de absorção com o λ_{max} calculado em 297 e 310 nm atribuído a transições HOMO-1→LUMO e HOMO→LUMO, respectivamente.

Diferentemente das benzofenonas substituídas com o átomo de oxigênio, a hidroxilação da 4-NH₂BF na posição *orto* (2-OH-4-NH₂BF) não induziu o pico de absorção na faixa do UVA, levando apenas a uma absorção extra na faixa do UVB. Essas absorções apresentam os coeficientes de distribuição dos orbitais ocupados, HOMO e HOMO-1, principalmente localizados no anel substituído A e em seu substituinte devido ao seu efeito indutivo.

A presença de substituintes aquilamina (-N(Me)₂ and -N(Et)₂) na posição *para* leva a um deslocamento para o vermelho de 311 nm da 4-N(Et)₂BF para 330 nm da 4,4'-N(Et)₂BF. Um menor deslocamento para o vermelho foi observado de 323 nm da 4-N(Me)₂BF para 334 nm da 4,4'-N(Me)₂BF. As transições eletrônicas desses derivados envolvem o anel substituído e seu substituinte (HOMO→LUMO).

Similarmente à 4-NH₂BF, a hidroxilação dos derivados alquilaminas, 2-OH-4-N(Me)₂BF e 2-OH-4-N(Et)₂BF, não induziu uma absorção em amplo espectro e apenas levou a um deslocamento para o vermelho. Devido a essa substituição, a 2-OH-4-N(Me)₂BF apresentou um deslocamento para o vermelho da região do UVB para a região do UVA (311/322nm), mostrando um efeito de ressonância forte relacionado ao grupo hidroxila.

Todas as dietilaminobenzofenonas exibem um único pico na região do UVA com transições de HOMO→LUMO envolvendo os anéis substituídos. A 4,4'-N(Et)₂BF apresentou a maior força de oscilação de todos os derivados estudados.

Quadro 4. Orbitais HOMO e LUMO das aminobenzofenonas.

| Subst-BF | HOMO-3 | HOMO-2 | HOMO-1 | HOMO | LUMO |
|----------------------------|--------|--------|--------|------|------|
| 2- NH ₂ | | | | | |
| 4- NH ₂ | | | | | |
| 4,4'-NH ₂ | | | | | |
| 2-OH, 4-NH ₂ | | | | | |
| 4-N(Me) ₂ | | | | | |
| 4,4'-N(Me) ₂ | | | | | |
| 2-OH,4-N(Me) ₂ | | | | | |
| 4 - N(Et) ₂ | | | | | |
| 4,4'- N(Et) ₂ | | | | | |
| 2-OH,4- N(Et) ₂ | | | | | |

5.1.3.3. Outros derivados

O λ_{max} calculado para as benzofenonas com os substituintes 2-COOH, 2-COOME e 2-COOEt exibiram absorção menor que 280 nm e, dessa forma, estão fora da faixa de absorção desejada.

5.2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO MMT-ODP

5.2.1. Desenvolvimento dos complexos de inclusão formados por MMT e ODP

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa investigaram o processo de inclusão do filtro solar ODP em montmorilonita (SOARES, 2003; COELHO *et al.*, 2008). Segundo Coelho e col. (2008), a inclusão do ODP em montmorilonita pode melhorar a sua funcionalidade e uso comercial.

Desta forma, a fim de otimizar a formação do complexo e dar continuidade às investigações das propriedades do material formado por meio da avaliação do potencial fotoprotetor em leveduras, realizou-se o processo de intercalação do ODP em MMT sódica tomando-se como base os resultados descritos por Soares (2003) e Coelho e col. (2008).

Soares (2003) observou o melhor rendimento de intercalação utilizando 1:1 de ODP e argila. Nessa proporção, o rendimento foi de aproximadamente 250 mmol de ODP/100 g de argila. Considerando que esse valor supera a CTC da MMT, esse rendimento não equivale à quantidade real de material intercalado. Pois, ocorre adsorção do material na superfície da argila.

Por isso, no presente trabalho, utilizou-se para a realização das reações de intercalação 1 g de MMT-Na e 280 mg de ODP, proporção que equivale a aproximadamente 100 mmol de ODP/100 g de MMT-Na, ou seja a CTC da argila em questão, minimizando a possibilidade de adsorção do material a ser intercalado.

Foram realizadas três reações nas mesmas condições, para avaliar a reprodutibilidade do processo de intercalação.

5.2.1.1. Solvente da reação

Utilizando o website Chemicalize.org (ChemAxon, Hungria) observou-se que o nitrogênio da amina terciária do ODP apresenta um valor de pka igual a 2,9. Esse sítio de protonação favorece a sua inclusão no espaço interlamelar

aniônico da MMT por troca iônica e interações eletrostáticas. Segundo Soares (2003), a protonação do grupamento amina presente na molécula do octil dimetil PABA é fundamental para que ocorra tal interação.

A Figura 15 apresenta as espécies, neutra e protonada, do filtro ODP.

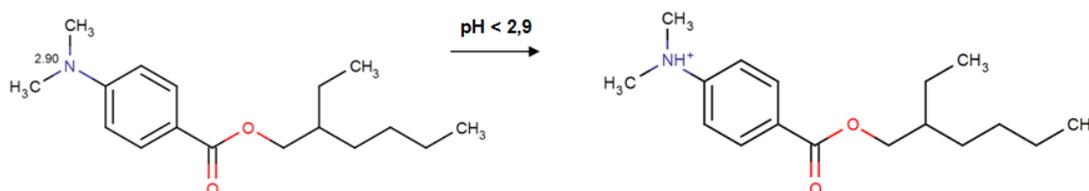


Figura 15. Espécies majoritárias do filtro solar ODP.

Visando à solubilidade e protonação do ODP no solvente da reação, utilizou-se a mistura de água e ácido acético com pH inferior a 2,9.

Para determinar a proporção ideal da mistura, avaliou-se a solubilidade do ODP em diferentes proporções de água e ácido acético e determinou-se a proporção 3:7 (v/v) como sendo ótima para a realização dos ensaios de intercalação. Sua ionização total é evidenciada por sua solubilização, visto que o ODP é insolúvel em água.

5.2.1.2. Curva padrão

Para construção da curva padrão, as leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 311 nm. Com os dados obtidos foi traçada a curva padrão do ODP em etanol, sendo esta submetida à regressão linear. A equação da reta obtida foi $y = 0,0995x + 0,0753$, com coeficiente de correlação linear com valor igual a 0,9995 (Figura 16). Observou-se uma linearidade entre a concentração do fármaco em solução com os valores de absorvância nesse comprimento de onda, o que mostra que a reta pode ser utilizada para quantificação do ODP no sobrenadante.

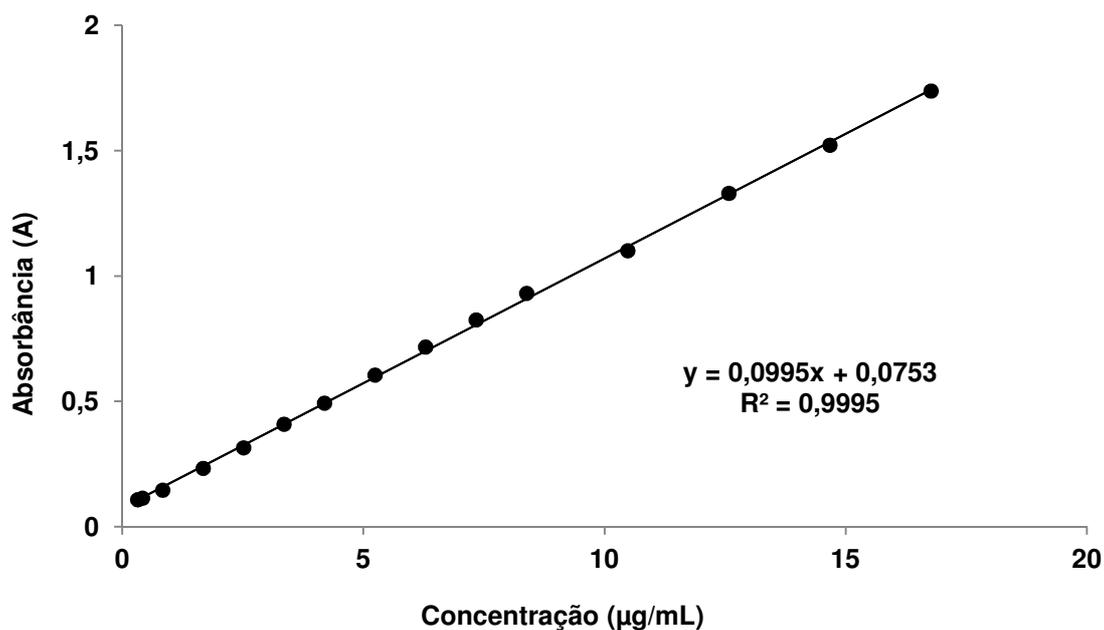


Figura 16. Curva padrão de ODP em etanol.

5.2.1.3. *Rendimento reacional*

Com base na curva padrão (Figura 16) do ODP em etanol, calculou-se o rendimento reacional (%) através da quantificação do filtro não intercalado pela leitura do sobrenadante diluído em etanol em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 311 nm. Com base nos valores de rendimento, calculou-se a proporção de ODP no material formado (mg ODP / g complexo).

Na Tabela 8 encontram-se os valores do rendimento das reações e a proporção de ODP no complexo formado.

Tabela 8. Rendimento e massa de ODP no complexo formado pelas reações.

| Reação | Rendimento (%) | Massa de ODP intercalada (mg ODP/g complexo) |
|---------------|-----------------------|---|
| 1 | 19,2 | 54,0 |
| 2 | 23,5 | 65,8 |
| 3 | 19,4 | 54,4 |

Os rendimentos reacionais observados são melhores do que aqueles observados por Soares (2003) em reações conduzidas no tempo de 30 minutos e com concentrações de filtro e argila que não superam a CTC da argila.

5.2.2. Caracterização

5.2.2.1. Difração de raios X

Os padrões de difração do produto da reação e da MMT-Na pura foram agrupados e são mostrados na Figura 17. O padrão de difração da MMT possibilita a avaliação comparativa dos ângulos 2θ referentes ao pico d_{001} . Aplicando-se a Lei de Bragg obtiveram-se as distâncias interlamelares de ambas as amostras analisadas e os valores estão evidenciados no gráfico.

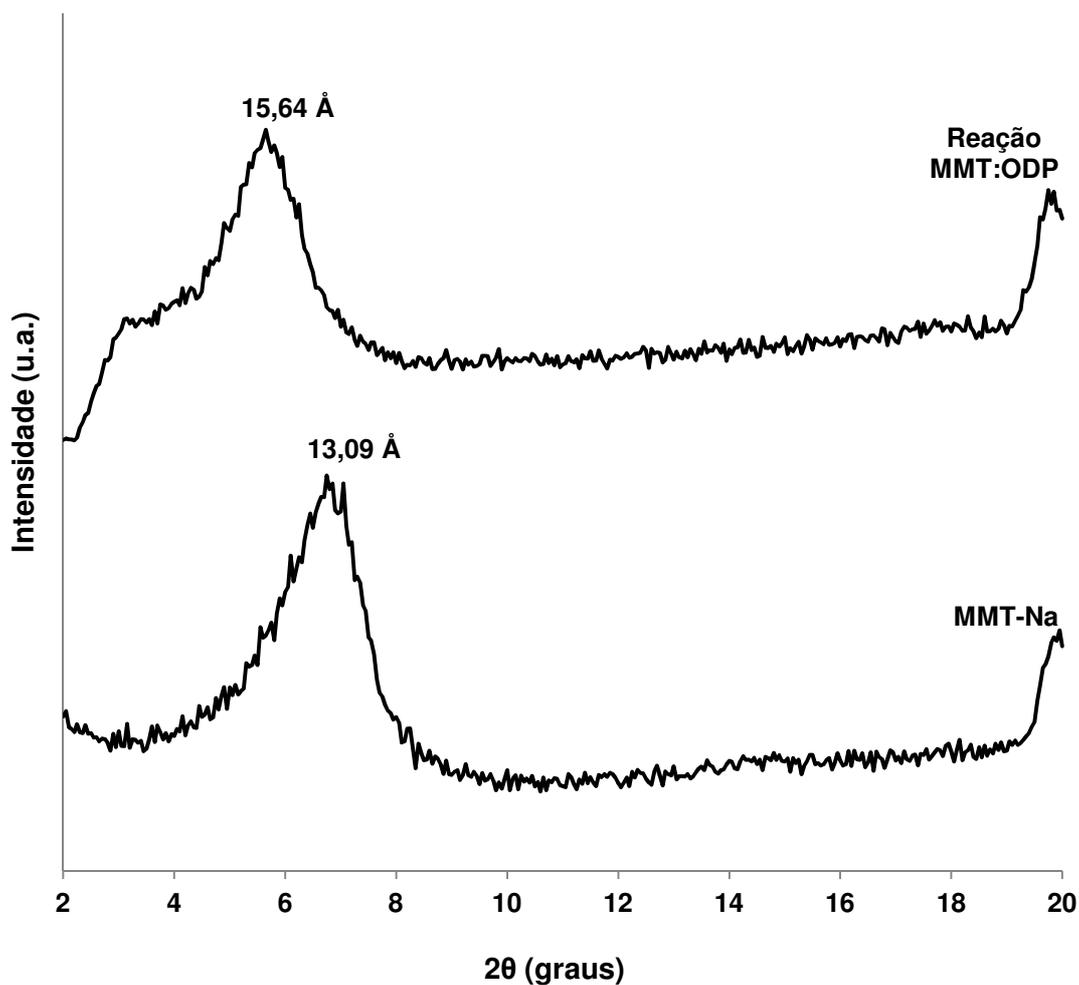


Figura 17. Padrões de difração do complexo MMT-ODP e da MMT-Na pura.

Observou-se uma diminuição nos valores do ângulo 2θ do complexo formado ($5,65^\circ$) em relação ao ângulo 2θ da MMT-Na pura ($6,75^\circ$), que indica o aumento do espaçamento interlamelar proveniente do processo reacional e da inclusão do filtro na argila. Esse aumento equivale a $2,55 \text{ \AA}$.

5.2.2.2. *Infravermelho por Transformada de Fourier*

A análise por IV-TF foi empregada para identificar a presença do filtro no complexo e avaliar as características da interação entre o ODP e a MMT.

Inicialmente, avaliou-se o espectro no infravermelho da MMT-Na pura. As bandas de absorção na região do IV da MMT-Na estão mostradas na Figura 18.

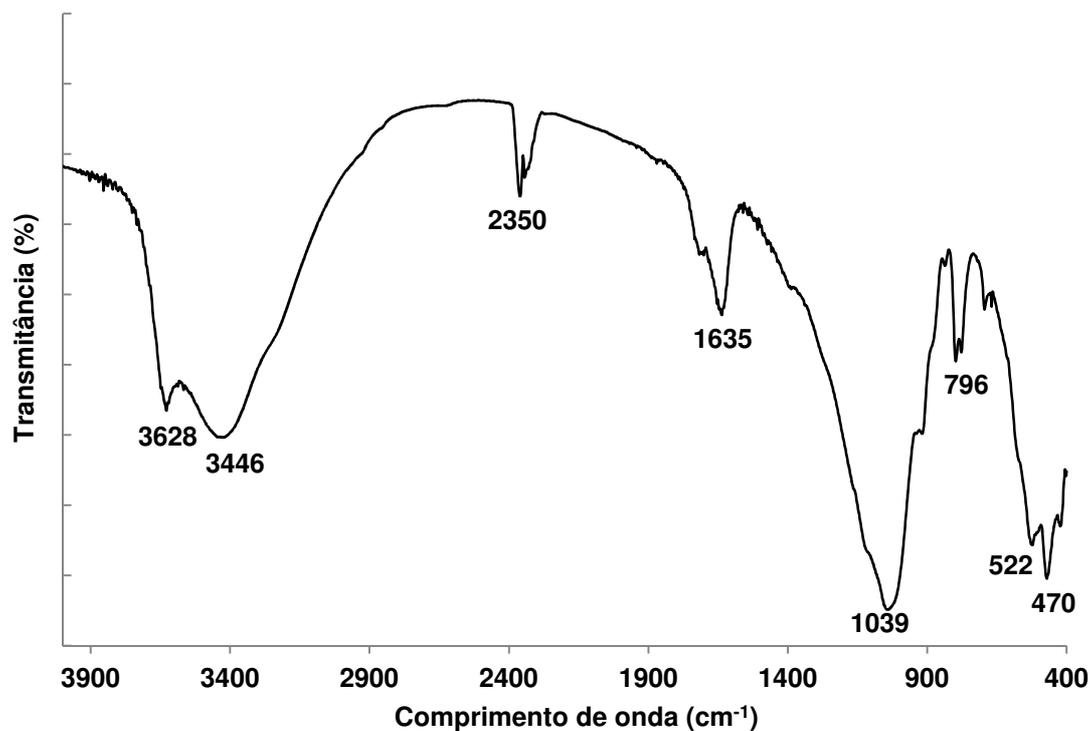


Figura 18. Espectro de IV-TF da MMT-Na.

O pico próximo a 3630 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento do grupo OH estrutural e ligações $\text{Mg}^{2+}\text{-OH}$ ou $\text{Al}^{3+}\text{-OH}$. A banda de absorção em 3446 cm^{-1} é atribuída a vibrações de estiramento do OH estrutural e da água, ambos envolvidos em ligação hidrogênio. A banda observada em 1635 cm^{-1} corresponde à deformação angular de moléculas de água. As bandas atribuídas às vibrações da rede dos silicatos estão na faixa entre 1100 a 450 cm^{-1} , sendo a banda intensa em 1039 cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico Si-O-Si e a banda em 796 cm^{-1} atribuída ao estiramento Si-O. Também é possível observar absorção em 522 cm^{-1} que corresponde a vibrações angulares de ligações Si-O, incluindo Si-O- Al^{3+} , e em 470 cm^{-1} devido a grupos Si-O-Si (BUKKA & MILLER & SHABTAI, 1992; DEL HOYO &

VICENTE & RIVES, 2001; PALUSZKIEWICZ et al., 2011; ERDOĞAN ALVER & ALVER, 2012). A banda em 2350 cm^{-1} indica dióxido de carbono.

Na Figura 19 estão agrupados os espectros de IV-TF da MMT-Na pura, ODP puro e do produto da reação MMT-ODP.

No espectro do produto da reação MMT-ODP (Figura 19) é possível observar que as bandas não mudam de posição, o que indica que a interação entre o ODP e a MMT é bastante fraca.

Os picos na faixa de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos ao estiramento C-H alifático presente no ODP. Esses picos são observados no complexo formado, evidenciando a presença de ODP no complexo (Figura 17).

É possível observar um alargamento da banda em 1039 cm^{-1} (estiramentos Si-O-Si) do produto da reação MMT-ODP em relação a observada na MMT-Na. Esse alargamento é proveniente da interferência dos picos de estiramento C-N presentes no ODP que ocorrem na faixa de $1350\text{ - }1000\text{ cm}^{-1}$.

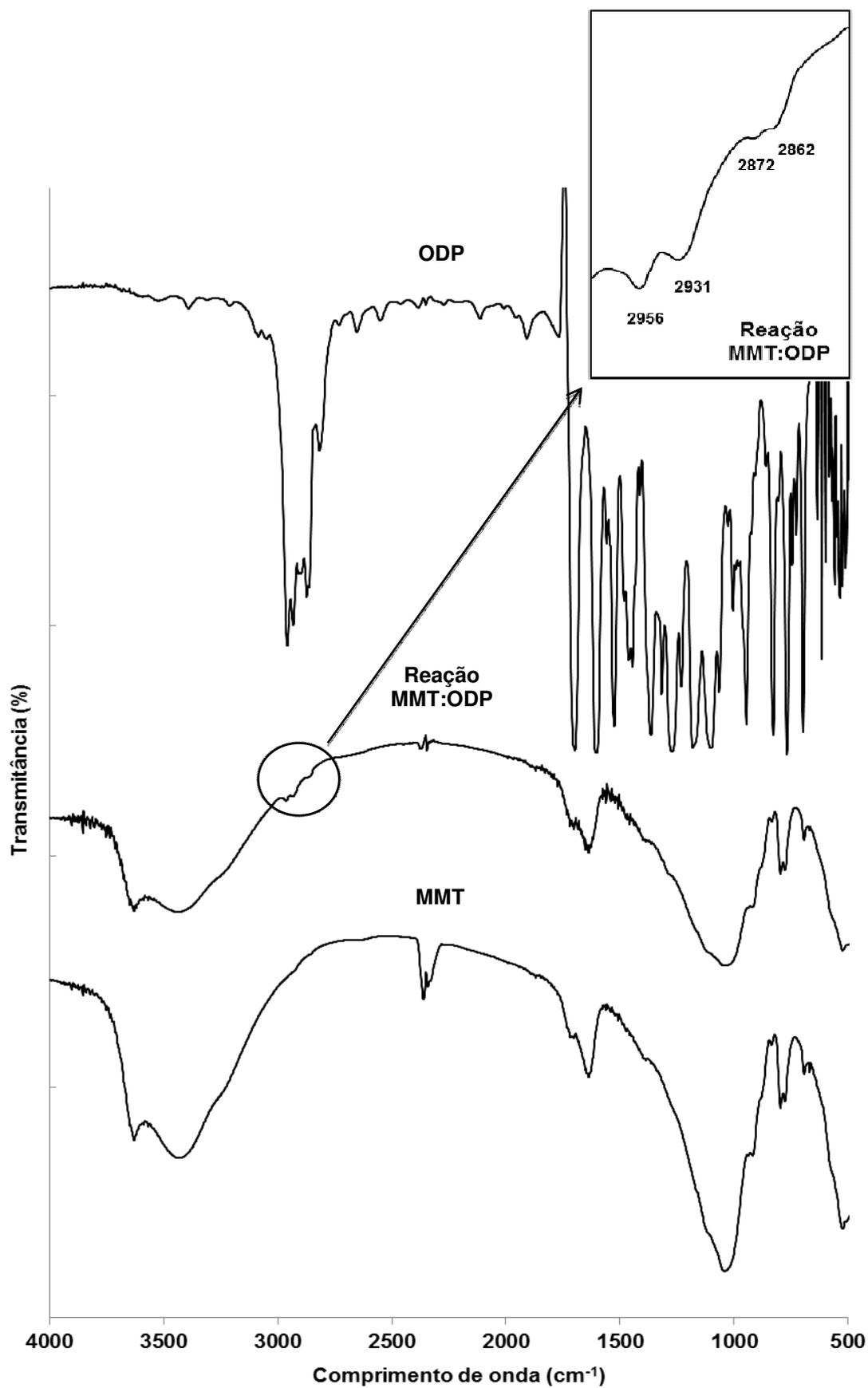


Figura 19. Espectros de IV-TF da MMT-Na pura, ODP puro e do complexo MMT:ODP.

5.2.2.3. Análise térmica

As curvas de DSC e TGA da MMT-Na pura e do produto da reação MMT: ODP estão mostradas da Figura 20.

Na curva da MMT-Na pura, a principal perda de massa ocorre até 100°C e corresponde 10,42% da perda de massa total da argila pura. Na curva de DSC, esse evento se apresenta como um pico endotérmico na temperatura a baixo de 100 °C e é atribuído à remoção de água fracamente adsorvida. Na análise do produto da reação MMT-ODP, é possível observar que há um menor conteúdo de água. Esse resultado pode indicar a intercalação do filtro, pois a característica hidrofóbica do material intercalado reduz a quantidade de água passível de ser acomodada no espaço interlamelar (DVININOV *et al.*, 2009). A perda de massa do complexo até a temperatura de 100 °C foi de 7,63%.

Entre 100 °C e 500 °C, a perda de massa observada na análise termogravimétrica da MMT é inferior a 3%, diferentemente da curva do complexo, que a perda de massa nesse intervalo corresponde a 8,3%. Os eventos relacionados com essa perda mais elevada podem ser decorrentes da decomposição do ODP adsorvido no complexo.

Em temperaturas maiores que 500°C, a MMT começa a se decompor por desidroxilação (COELHO & SANTOS & SANTOS, 2007; DVININOV *et al.*, 2009). Segundo Dvininov e col. (2009), em 550 °C ocorre uma redução do espaçamento basal e a estrutura da argila colapsa.

Na curva de DSC, a ausência de eventos térmicos relacionados ao filtro (ODP) na faixa de temperatura analisada é resultante da pequena concentração de filtro intercalado no material.

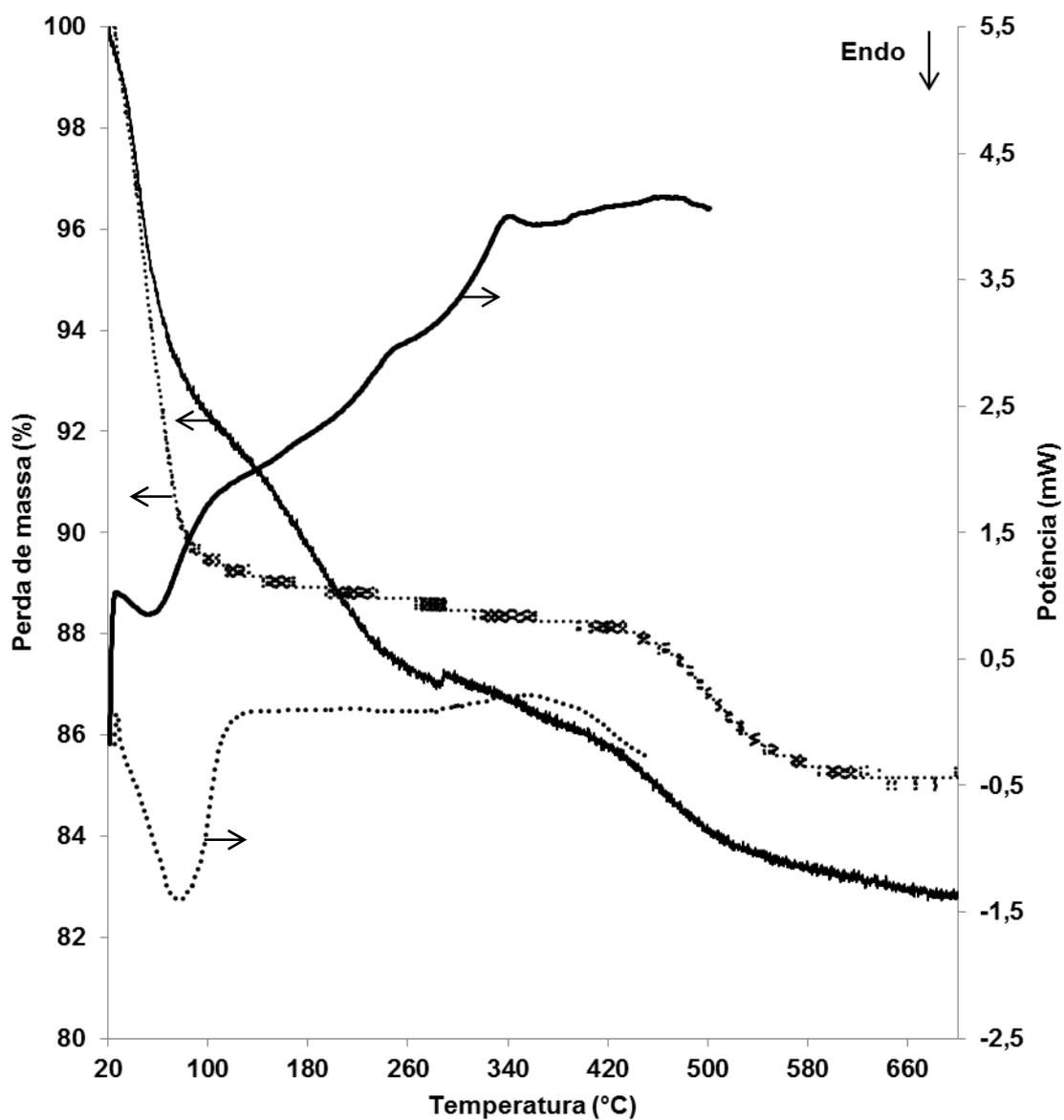


Figura 20. Curvas de DSC e TGA da MMT-Na pura (linhas pontilhadas) e do produto da reação de intercalação MMT:ODP (linhas sólidas).

5.2.2.4. Análise de tamanho de partículas por difração de laser (LD)

A Figura 22 apresenta a distribuição de tamanho de partícula da MMT-Na pura e dos complexos MMT-ODP formados. É possível observar um comportamento bimodal da distribuição de tamanho do complexo que compreende a faixa entre 0,4 e 500 μm , com picos em aproximadamente 4 μm e 200 μm . Para a MMT-Na pura, o maior volume de partícula apresenta tamanho aproximado de 20 μm .

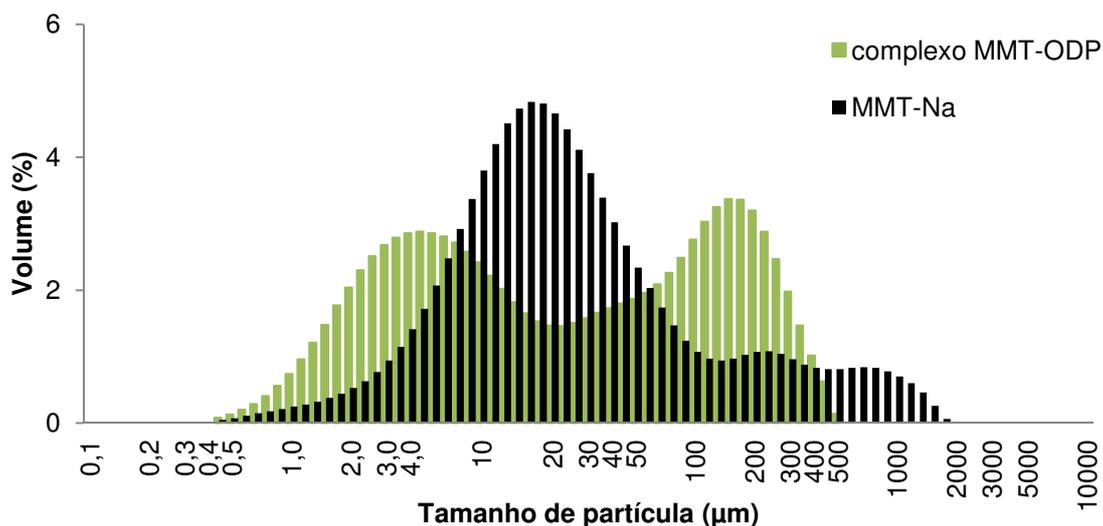


Figura 21. Distribuição de tamanho de partícula da MMT-Na e do complexo MMT-ODP.

5.2.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos complexos MMT-ODP

A sobrevivência e mutagenese da *S. cerevisiae* exposta à radiação UVB e pré-tratada ou não com a mistura física de MMT-Na e ODP ou com o complexo MMT-ODP foi determinada para avaliação dos efeitos fotoprotetor do novo material formado em organismos vivos.

A mistura física foi feita com a proporção de MMT-Na e ODP semelhante ao rendimento reacional do complexo.

A concentração do complexo em todos os experimentos foi de 100 µg/mL em água destilada a 30°C, sob agitação. Nas condições experimentais, essa foi a concentração máxima previamente estabelecida por Pinto e col. (2010) que é não tóxica para a *S. cerevisiae*.

Como pode ser observado na Figura 22, a cepa *ogg1* é bastante sensível ao UVB. A sensibilidade se mostrou semelhante para as cepas pré-tratadas e sem tratamento até 10 kJ/m². No entanto, de 15 até 30 kJ/m², a levedura apresentou maior resistência ao UVB na ausência de MMT e ODP. Esses resultados sugerem que a mistura física e o complexo de MMT e ODP podem contribuir com a toxicidade celular em altas doses de UVB.

Contrariamente ao resultado de sobrevivência, na DL₁₀, a indução da mutagenese pela radiação UVB foi maior na ausência de MMT e ODP (Figura 23). Portanto, em baixas doses de UVB, a mistura física de MMT-Na e ODP ou o complexo MMT-ODP são capazes de proteger as células contra os efeitos mutagênicos dessa radiação, sem contribuir com os efeitos tóxicos.

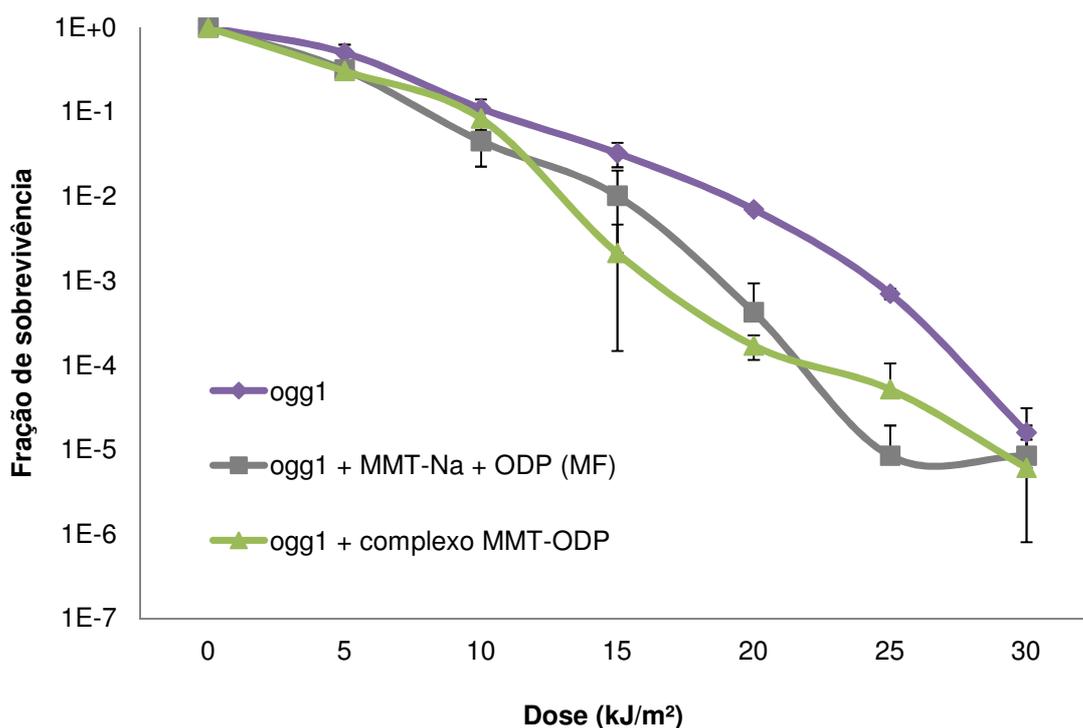


Figura 22. Sobrevivência da cepa CD138 (*ogg1*) após tratamento com UVB, pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e ODP ou com o complexo MMT-ODP. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos.

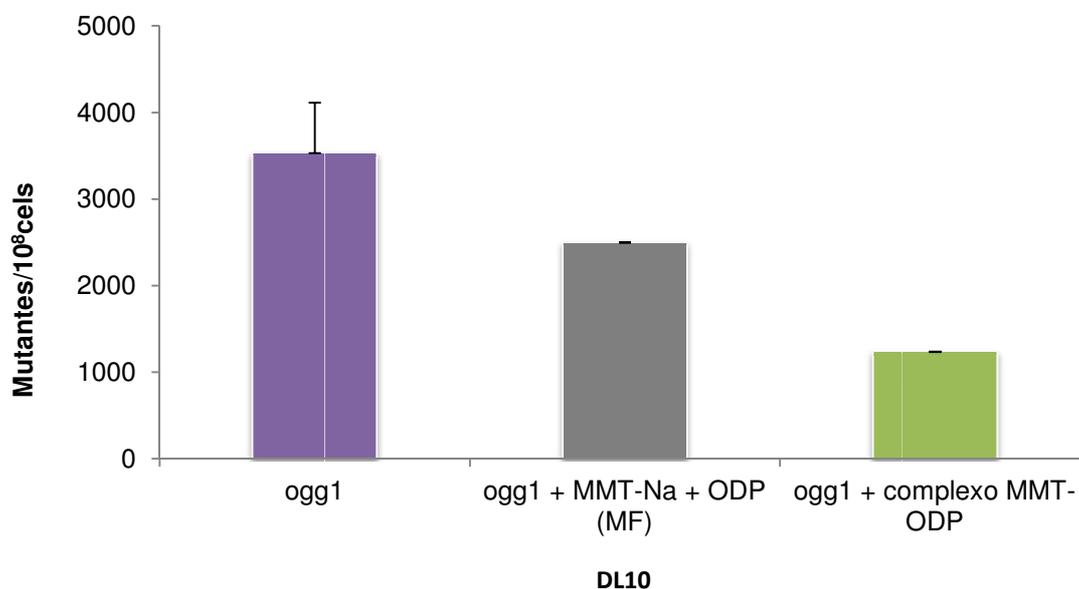


Figura 23. Mutagênese da cepa CD138 (*ogg1*) após tratamento com UVB de 10 kJ/m² (DL₁₀), pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e ODP ou com o complexo MMT-ODP. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos.

5.3. NANOSISTEMAS MMT-TiO₂

5.3.1. Preparação de nanosistemas formados por MMT-Na e TiO₂

Segundo estudos ainda não publicados de Paiva e col., em comparação com os materiais isolados, a mistura física de TiO₂ e MMT-Na aumentou significativamente a sobrevivência e reduziu a mutagenicidade de leveduras expostas à radiação UVB. Desta forma, visando dar continuidade a esses estudos, realizou-se o desenvolvimento e caracterização de nanosistemas proveniente da intercalação TiO₂ em MMT-Na.

O procedimento de preparo dos nanosistemas consistiu na dispersão em água de MMT e TiO₂ (1:1) seguida de sonicação (60 W) por um período de 45 minutos. Para verificar se houve formação de nanosistemas de TiO₂-MMT, após a reação, o material foi liofilizado e analisado por DRX, FTIR, DSC e TGA. O tempo de reação escolhido foi aquele que poderia diminuir o teor de esfoliação da argila pelo processo de sonicação, buscando a intercalação do TiO₂ nos espaços interlamelares da MMT.

Depois da caracterização, avaliou-se o potencial fotoprotetor do nanosistema em colaboração com aluna de mestrado Juliana Patrão de Paiva do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ no Laboratório de Radiobiologia Molecular, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

5.3.2. Caracterização

Os espaços interlamelares da MMT-Na sonicada, mistura física MMT-Na e TiO₂ e produto da reação MMT-TiO₂ determinados pela análise de difração de raios X foram comparados. A Figura 24 apresenta os padrões de difração desses materiais.

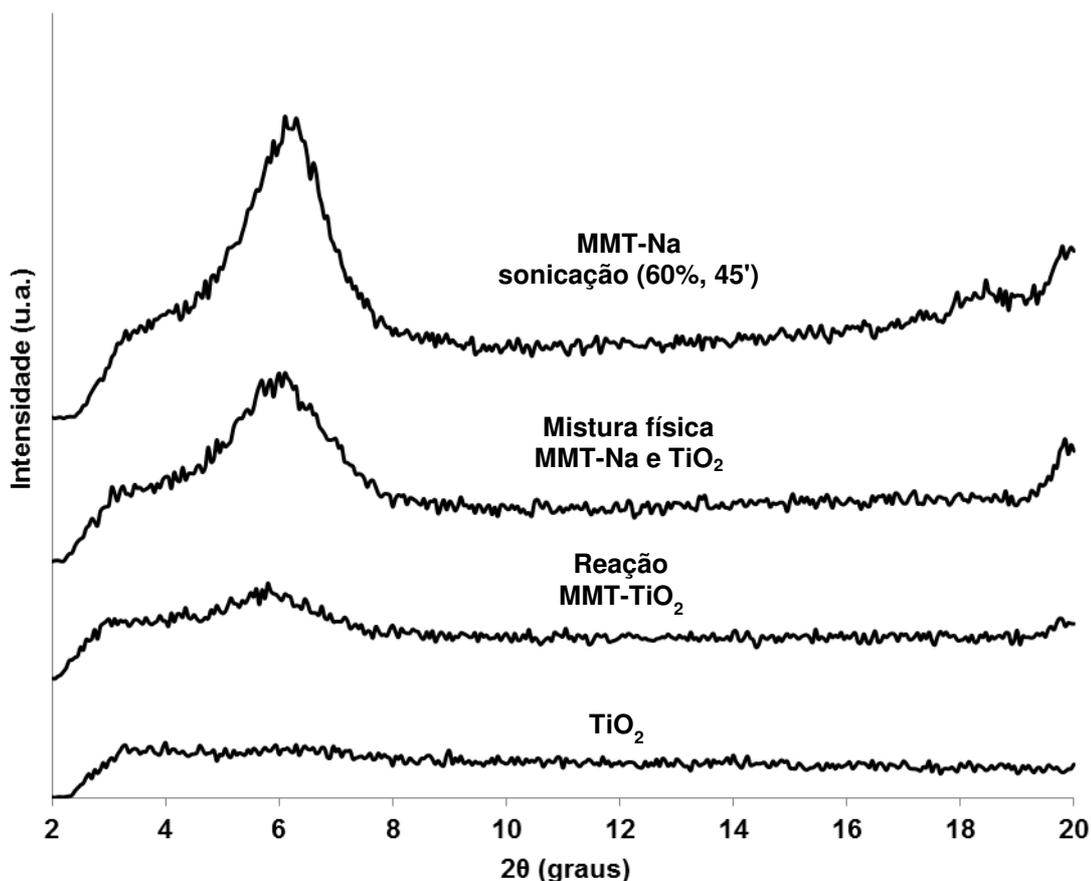


Figura 24. Padrões de difração da MMT-Na pura e sonicada, mistura física de MMT-Na e TiO₂, do produto da reação de intercalação MMT-TiO₂ e do dióxido de titânio puro em intervalo de 2θ entre 2 e 20 graus.

Os valores do ângulo 2θ referentes ao pico d_{001} da argila deixada sob sonicação por 45 minutos e da mistura física MMT-Na e TiO₂ são semelhantes e equivalem ao espaçamento basal de 14,48 Å e 15,04 Å, respectivamente.

Para o produto da reação MMT-TiO₂, é possível observar um desaparecimento do pico basal (d_{001}) no intervalo de 2θ entre 2 e 20°, provavelmente devido a um maior espaçamento interlamelar e/ou delaminação/esfoliação da MMT.

Esse resultado indica que o TiO₂ é capaz de interagir com as lamelas de forma a romper as interações interlamelares, possibilitando a esfoliação da argila e formação do nanossistema, devido as dimensões das lamelas delaminadas.

O padrão de difração do dióxido de titânio também foi avaliado no intervalo de 2θ entre 2° e 20° e nenhum pico foi identificado. Os picos característicos do TiO_2 anatase são observados em valores de 2θ de 25.3° , 37.8° , 47.7° and 54.9° (CHEN *et al.*, 2012). Por isso, com o intuito de investigar alterações na estrutura cristalina do TiO_2 anatase, realizou-se a análise de difração de raios X também no intervalo de 2θ entre 20° e 60° (Figura 25).

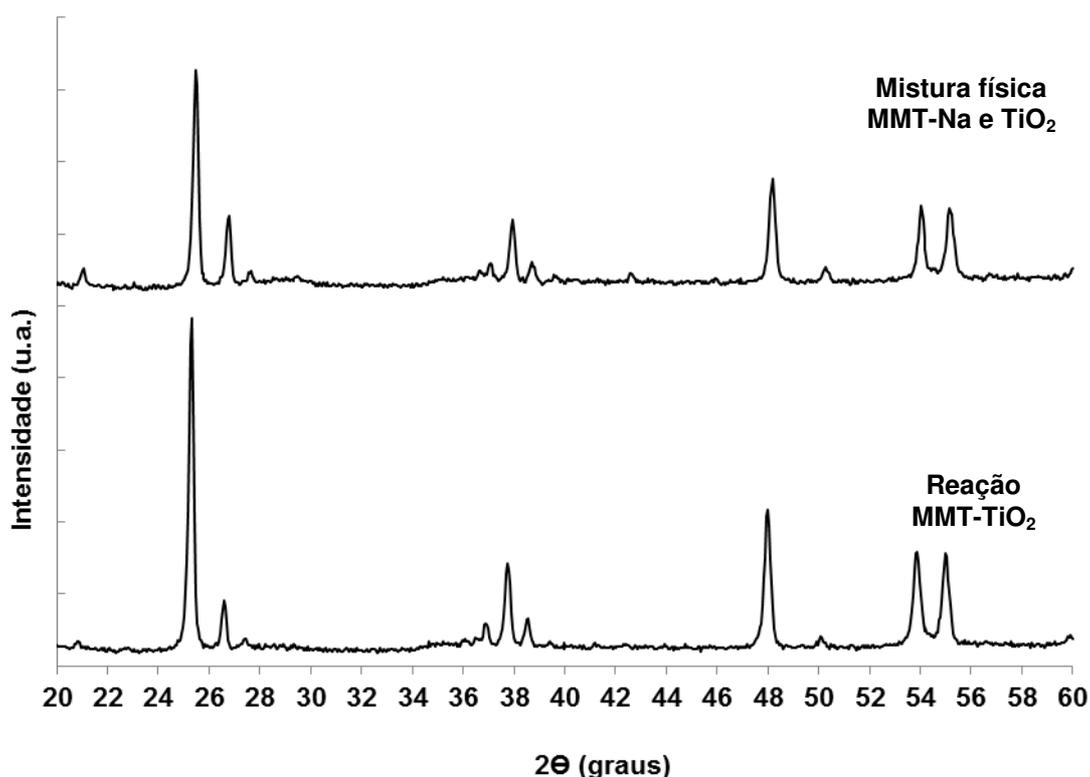


Figura 25. Padrões de difração da mistura física de MMT-Na e TiO_2 e do produto da reação de intercalação MMT- TiO_2 em intervalo de 2θ entre 20 e 60 graus.

Como observado na Figura 25, os picos característicos do polimorfo anatase do dióxido de titânio foram identificados tanto na mistura física, quanto no produto da reação de intercalação. Portanto, a estrutura do cristal anatase do dióxido de titânio foi mantida, mesmo após o processo de intercalação.

Os espectros de IV não apresentaram qualquer deslocamento significativo dos sinais observados na mistura física e no produto da reação de

intercalação e, por isso, a técnica não se mostra efetiva na elucidação da formação do nanosistema.

As curvas de DSC e TGA da mistura física de MMT-Na e TiO_2 e do produto da reação MMT-ODP estão mostradas na Figura 26. A principal perda de massa para ambos os materiais analisados ocorre até 100°C . Na curva de DSC, esse evento se apresenta como um pico endotérmico na temperatura a baixo de 100°C e é atribuído à remoção de água fracamente adsorvida.

A MMT começa a se decompor por desidroxilação em temperaturas maiores que 500°C (COELHO & SANTOS & SANTOS, 2007; DVININOV *et al.*, 2009; DVININOV *et al.*, 2009). É possível observar uma menor perda de massa do nanosistema em relação à mistura física acima de 500°C (Figura 26). Pode-se concluir que o material formado apresenta maior estabilidade térmica.

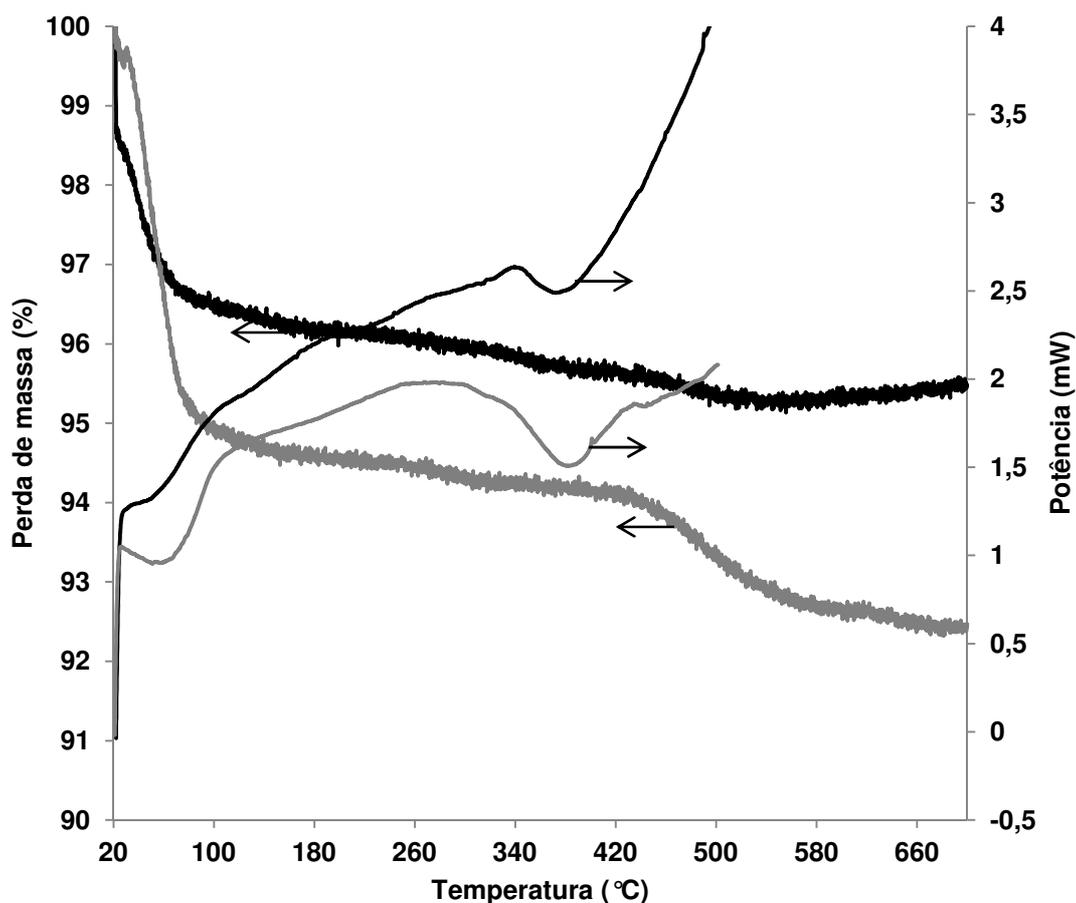


Figura 26. Curvas de DSC e TGA da mistura física de MMT-Na e TiO_2 (cinza) e do produto da reação de intercalação MMT- TiO_2 (preto).

Na análise de tamanho de partículas por difração de laser (Figura 27), foi possível observar que o material formado (MMT- TiO_2 nano) apresenta distribuição de tamanho em uma faixa semelhante ao TiO_2 e em uma faixa de tamanho maior que a argila. Esses resultados somados aos observados na análise de DRX indicam que o nanossistema apresenta distribuição de tamanho semelhante ao TiO_2 , porém está aglomerado e, mesmo com a sonicação antes a análise de tamanho, não houve dispersão completa do material. Porém, os resultados não são conclusivos e serão necessárias mais análises, como determinação da área superficial e microscopia eletrônica, para observar a característica das partículas.

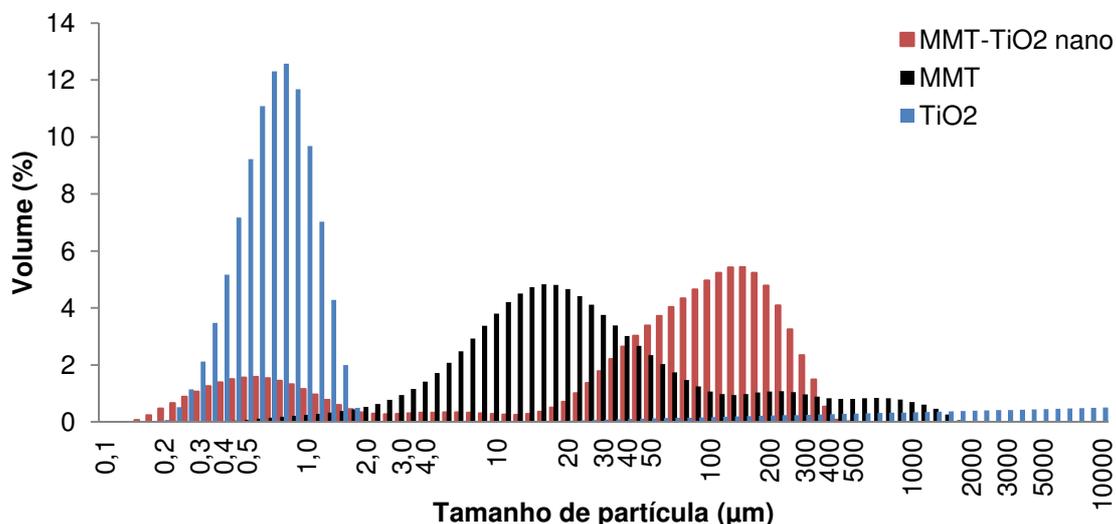


Figura 27. Distribuição de tamanho de partículas do TiO₂ e MMT-Na puros e do nanosistema de MMT-TiO₂.

5.3.3. Avaliação do potencial fotoprotetor dos nanosistemas MMT-TiO₂

De acordo com resultados não publicados por Paiva e col. (2013) (Figura 10 e Figura 11), a cepa CD138 irradiada por UVB se mostrou mais resistente e apresentou menor índice de mutantes quando pré-tratada pela mistura física de MMT-Na e do TiO₂. Buscando aprimorar a fotoproteção observada pela associação da argila com o filtro inorgânico, o nanosistema foi desenvolvido e seu potencial fotoprotetor foi avaliado.

A concentração do complexo em todos os experimentos foi de 100 µg/mL em água destilada a 30°C, sob agitação (PINTO *et al.*, 2010).

A Figura 28 apresenta a resposta da *S. cerevisiae* a diferentes doses da radiação UVB na presença do nanosistema de MMT-TiO₂. A sensibilidade das cepas tratadas apenas com UVB foi maior. A presença do nanosistema MMT-

TiO₂ não aumentou a resistência ao UVB em comparação com a mistura física desses materiais. No entanto, a mutagênese das leveduras pré-tratadas com o nanosistema reduziu drasticamente (Figura 29), superando a proteção contra os efeitos mutagênicos da radiação UVB observada nas leveduras tratadas com a mistura física MMT + TiO₂.

Esses resultados sugerem que o novo material obtido a partir da reação entre a MMT-Na e o TiO₂ é promissor para a prevenção de danos causados pela radiação UVB.

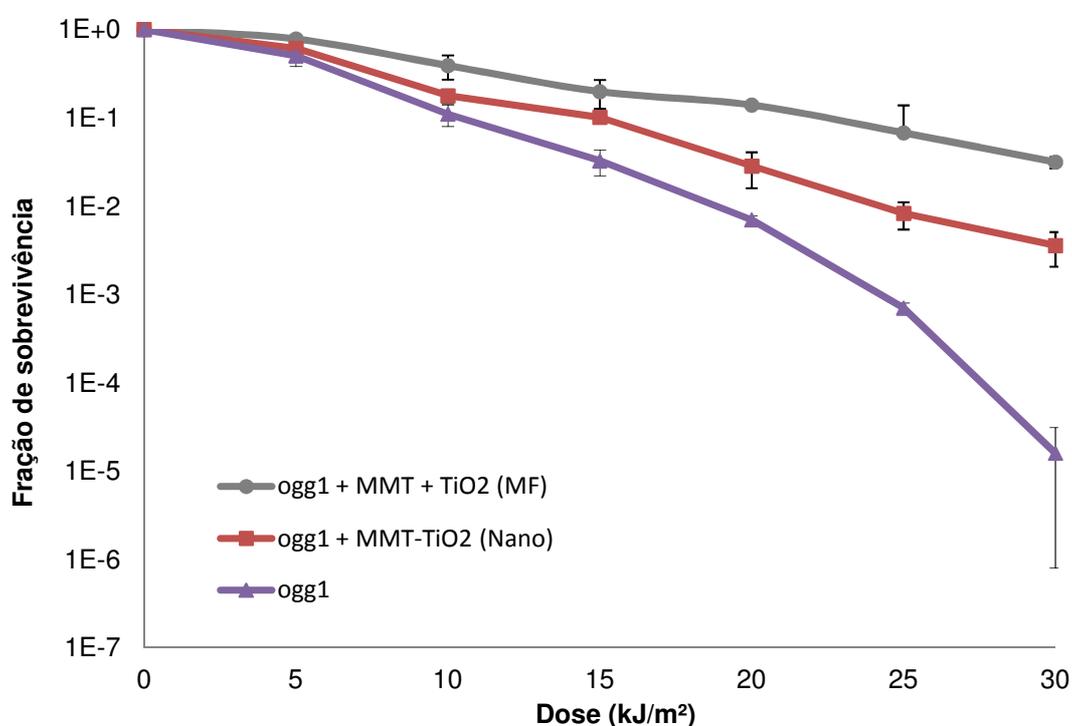


Figura 28. Sobrevivência da cepa CD138 (*ogg1*) após tratamento com UVB, pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e TiO₂ ou com o nanosistema MMT-TiO₂. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos.

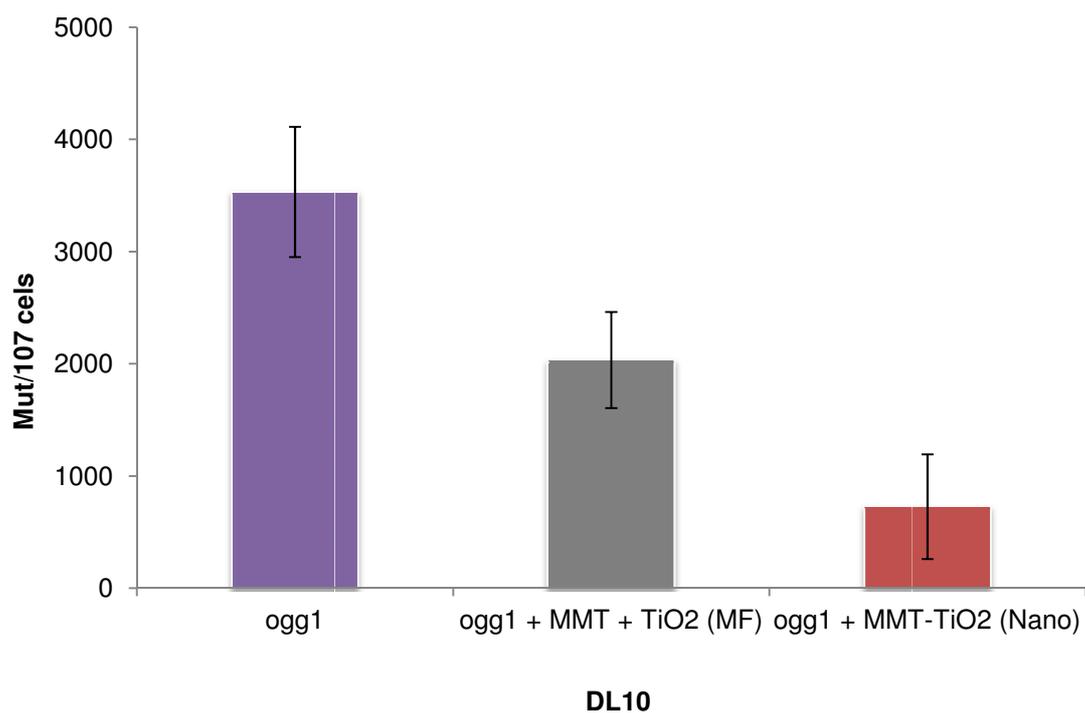


Figura 29. Mutagênese da cepa CD138 (ogg1) após tratamento com UVB de 10 kJ/m² (DL₁₀), pré-tratada ou não com a mistura física (MF) de MMT-Na e TiO₂ ou com o nanosistema MMT-TiO₂. Estes resultados representam a média de no mínimo três experimentos.

6. CONCLUSÃO

Realizou-se o estudo teórico do perfil de absorção UVA/UVB de uma série de derivados de benzofenonas (BFs) e estabeleceram-se as relações estrutura-propriedade de absorção UV. A força de oscilação parece aumentar na presença da dissubstituição na posição *para*. A posição de substituintes próticos parece estar relacionada com o pico de absorção: a absorção na faixa do UVB ocorre na presença da substituição na posição *para*, enquanto a substituição em *orto* leva a uma absorção na região do UVA. Esses resultados podem ser racionalizados em estudos posteriores visando o desenvolvimento de novos ativos fotoprotetores.

Foi possível intercalar o octil-dimetil-PABA na montmorilonita, no entanto, o material obtido não se mostrou eficaz para proteger as células contra os efeitos letais da radiação UVB. Em baixas doses de UVB, o complexo MMT-ODP é capaz de proteger as células contra os efeitos mutagênicos dessa radiação, sem contribuir com os efeitos letais.

O nanosistema MMT-TiO₂ formado parece ser um ativo fotoprotetor promissor. O dióxido de titânio de mostra capaz de esfoliar a argila sem alterar sua estrutura cristalina. O nanosistema formado não apresentou maior proteção contra os efeitos letais da radiação UVB. No entanto, o número de mutantes reduziu drasticamente, superando a proteção, contra os efeitos mutagênicos, observada para a mistura física.

O presente trabalho compila informações importantes para desenvolvimento de novos ativos fotoprotetores mais eficazes e seguros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. R. M. P. D.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, p. 1145-1154, 2002.

ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H. et al. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 191-195, 2001.

AMAT, A.; CLEMENTI, C.; DE ANGELIS, F. et al. Absorption and emission of the apigenin and luteolin flavonoids: a TDDFT investigation. **J Phys Chem A**, v. 113, n. 52, p. 15118-26, Dec 31 2009.

ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; ROSSI, C. et al. New microencapsulated sunscreens: technology and comparative evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 207-211, 2002.

ANVISA. **RDC nº 47 - Regulamento técnico Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes**. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2006.

ARUMUGAM, S. K.; SASTRY, T. P.; SREEDHAR, B. et al. One step synthesis of silver nanorods by autoreduction of aqueous silver ions with hydroxyapatite: An inorganic-inorganic hybrid nanocomposite. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80A, n. 2, p. 391-398, 2007.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.

BAMGBELU, A.; WANG, J.; LESZCZYNSKI, J. TDDFT study of the optical properties of Cy5 and its derivatives. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 10, p. 3551-3555, 2010.

BARONE, V.; POLIMENO, A. Integrated computational strategies for UV/vis spectra of large molecules in solution. **Chem Soc Rev**, v. 36, n. 11, p. 1724-31, Nov 2007.

BAUGHMAN, B. M.; STENNETT, E.; LIPNER, R. E. et al. Structural and spectroscopic studies of the photophysical properties of benzophenone derivatives. **J Phys Chem A**, v. 113, n. 28, p. 8011-9, Jul 16 2009.

BECKE, A. D. Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; CHEVALIER, Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 5, p. 463-478, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Proteção solar: sua pele merece esse cuidado. http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/prot_solar/index3.htm, 2004. Acesso em: 27 fev 2012.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.466, de 31 de agosto de 2010. Torna pública a proposta de Projeto de Resolução - Regulamento Técnico MERCOSUL Sobre Protetores Solares em Cosméticos. 2010.

BUKKA, K.; MILLER, J. D.; SHABTAI, J. FTIR Study of Deuterated Montmorillonites: Structural Features Relevant to Pillared Clay Stability. **Clays and Clay Minerals**, v. 40, n. 1, p. 92-102, 1992.

CARRETERO, M. I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. **Applied Clay Science**, v. 21, n. 3-4, p. 155-163, 2002.

CHEN, D.; ZHU, Q.; ZHOU, F. et al. Synthesis and photocatalytic performances of the TiO₂ pillared montmorillonite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 235-236, n. 0, p. 186-193, 2012.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. D. S.; SANTOS, H. D. S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas - uma revisão. **Química Nova**, v. 30, p. 1282-1294, 2007.

COELHO, G. L.; DORNELAS, C. B.; SOARES, K. C. et al. Preparation and evaluation of inclusion complexes of commercial sunscreens in cyclodextrins and montmorillonites: performance and substantivity studies. **Drug Development and Industry Pharmacy**, v. 34, n. 5, p. 536-46, 2008.

CORRÊA, B. A. M. **Modelagem molecular, docking e estudos teóricos do espectro eletrônico de absorção de derivados da benzofenona**. 2010. 107 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COSTA, J.; LACAZ, E. Fotoprotetores. **Med Cut Iber Lat Am.**, v. 29, p. 145-52, 2001.

COX, P. J.; KECHAGIAS, D.; KELLY, O. Conformations of substituted benzophenones. **Acta Crystallographica Section B**, v. 64, n. 2, p. 206-216, 2008.

COZZOLI, P. D.; COMPARELLI, R.; FANIZZA, E. et al. Photocatalytic Synthesis of Silver Nanoparticles Stabilized by TiO₂ Nanorods: A Semiconductor/Metal Nanocomposite in Homogeneous Nonpolar Solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 12, p. 3868-3879, 2004/03/01 2004.

CUNHA, V. R. R.; FERREIRA, A. M. D. C.; CONSTANTINO, V. R. L. et al. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v. 33, p. 159-171, 2010.

DANIEL, L. M.; FROST, R. L.; ZHU, H. Y. Laponite-supported titania photocatalysts. **J Colloid Interface Sci**, v. 322, n. 1, p. 190-195, 2008.

DEL HOYO, C.; VICENTE, M. A.; RIVES, V. Preparation of drug-montmorillonite UV-radiation protection compounds by gas-solid adsorption. **Clay Minerals**, v. 36, n. 4, p. 541-546, December 1, 2001 2001.

DEL HOYO, C. M.; RIVES, V.; VICENTE, M. A. Application of Methyl Cinnamate/Montmorillonite as Ultraviolet Radiation Shelters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22, n. 11, p. 1089-1095, 1996.

DILLING, W. L. The Effect of Solvent on the Electronic Transitions of Benzophenone and Its o- and p-Hydroxy Derivatives. **J. Org. Chem.**, v. 31, n. 4, p. 1045-1050, 1966.

DOS SANTOS ALMEIDA, A.; TAVARES, M. I. B.; OLIVEIRA DA SILVA, E. et al. Development of hybrid nanocomposites based on PLLA and low-field NMR characterization. **Polymer Testing**, v. 31, n. 2, p. 267-275, 2012.

DUNFORD, R.; SALINARO, A.; CAI, L. et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. **FEBS Letters**, v. 418, n. 1-2, p. 87-90, 1997.

DVININOV, E.; POPOVICI, E.; PODE, R. et al. Synthesis and characterization of TiO₂-pillared Romanian clay and their application for azoic dyes photodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1-3, p. 1050-1056, 2009.

ERDOĞAN ALVER, B.; ALVER, Ö. The investigation of the effect of thermal treatment on bentonites from Turkey with Fourier transform infrared and solid state nuclear magnetic resonance spectroscopic methods. **Spectrochimica**

Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 94, n. 0, p. 331-333, 2012.

FERGUSON, G.; GLIDEWELL, C. 4,4'-Dihydroxybenzophenone. **Acta Crystallographica Section B**, v. 52 p. 3057, 1996.

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

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

FONSECA, M. G. D.; AIROLDI, C. Híbridos inorgânico-orgânicos derivados da reação de filossilatos com organossilanos. **Química Nova**, v. 26, p. 699-707, 2003.

FORESTIER, S. Rationale for sunscreen development. **J Am Acad Dermatol.**, v. 58, p. 133-8, 2008.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. et al. **DNA Repair And Mutagenesis**. Washington, DC-USA: ASM Press, 2005.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 119-131, 2006.

GROSS, E. K. U.; KOHN, W. Time-Dependent Density-Functional Theory. In: PER-OLOV, L. (Ed.). **Advances in Quantum Chemistry**: Academic Press, v. Volume 21, 1990. p.255-291. ISBN 0065-3276.

GUO, S.; SU, G.; PAN, F. et al. Structure of 4-methoxybenzophenone. **Acta Crystallographica Section C**, v. 48, n. 3, p. 576-578, 1992.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HANNO, I.; ANSELMINI, C.; BOUCHEMAL, K. Polyamide Nanocapsules and Nano-emulsions Containing Parsol® MCX and Parsol® 1789: <i>In Vitro</i> Release, <i>Ex Vivo</i> Skin Penetration and Photo-Stability Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 2, p. 559-573, 2012.

HEARING, V. J. Determination of Melanin Synthetic Pathways. **J Invest Dermatol**, v. 17, n. 131(E1), p. E8-E11, 2011.

HEWITT, J. P. Titanium dioxide:a different kind of sunshield. **Drug Cosmet Ind** v. 151, n. 3, p. 26-32, 1992.

HOUK, J.; GUY, R. H. Membrane models for skin penetration studies. **Chemical Reviews**, v. 88, n. 3, p. 455-472, 1988/05/01 1988.

IMPROTA, R.; SANTORO, F. Excited-state behavior of trans and cis isomers of stilbene and stiff stilbene: a TD-DFT study. **J Phys Chem A**, v. 109, n. 44, p. 10058-67, Nov 10 2005.

INCA. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2011.

JACQUEMIN, D.; PERPETE, E. A.; CIOFINI, I. et al. Accurate simulation of optical properties in dyes. **Acc Chem Res**, v. 42, n. 2, p. 326-34, Feb 17 2009.

JEAN, C.; BOGDANOWICZ, P.; HAURE, M.-J. et al. UVA-activated synthesis of metalloproteinases 1, 3 and 9 is prevented by a broad-spectrum sunscreen. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 27, n. 6, p. 318-324, 2011.

JEON, H. K.; SARMA, S. N.; KIM, Y. J. et al. Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats. **Toxicology**, v. 248, n. 2-3, p. 89-95, Jun 27 2008.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. D. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, p. 281-288, 2005.

JOSHI, G. V.; KEVADIYA, B. D.; BAJAJ, H. C. Design and evaluation of controlled drug delivery system of buspirone using inorganic layered clay mineral. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 132, n. 3, p. 526-530, 2010.

JOSHI, G. V.; KEVADIYA, B. D.; PATEL, H. A. et al. Montmorillonite as a drug delivery system: Intercalation and in vitro release of timolol maleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, n. 1-2, p. 53-57, 2009.

KEVADIYA, B. D.; JOSHI, G. V.; PATEL, H. A. et al. Montmorillonite-alginate nanocomposites as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of vitamin B1 and vitamin B6. **J Biomater Appl**, v. 25, n. 2, p. 161-77, Aug 2010.

KEVADIYA, B. D.; PATEL, H. A.; JOSHI, G. V. et al. Montmorillonite-Alginate Composites as a Drug delivery System: Intercalation and In vitro Release of Diclofenac sodium. **Indian J Pharm Sci**, v. 72, n. 6, p. 732-7, Nov 2010.

KLIKA, Z.; WEISSMANNOVA, H.; CAPKOVA, P. et al. The rhodamine B intercalation of montmorillonite. **J Colloid Interface Sci**, v. 275, n. 1, p. 243-50, Jul 1 2004.

KOO, J. H. **Polymer nanocomposites: Processing, characterization and applications**. 1. McGraw-Hill, 2006.

KOOIJMAN, H.; TEN CATE, M. G. J.; VAN LEEUWEN, F. W. B. et al. Crystal structure of 4-Hydroxybenzophenone. **Private Communication**, 2005.

KUS, P.; JONES, P. G. Synthesis of New Tetraoxacyclophanes Containing Benzophenone Units **Polish J. Chem.**, v. 74, p. 965-977, 2000.

KUTZKE, H.; KLAPPER, H.; HAMMOND, R. B. et al. Metastable [beta]-phase of benzophenone: independent structure determinations via X-ray powder diffraction and single crystal studies. **Acta Crystallographica Section B**, v. 56, n. 3, p. 486-496, 2000.

LASINSKI, M. E.; ROMERO, N. A.; YAU, A. D. et al. Optimization and Parallelization of DFT and TDDFT in GAMESS on DoD HPC Machines. **DoD HPCMP Users Group Conference 2008**, p. 437-441, 2008.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LENAERS, C.; BOUDIER, D.; BARRUCHE, V. et al. **Nova abordagem para proteção do DNA**. *Cosmetics & Toiletries Brasil*. 19 2007.

LIEBICH, B. The crystal and molecular structure of 2,4-dihydroxybenzophenone (HHB). **Acta Crystallographica Section B**, v. 35, n. 5, p. 1186-1190, 1979.

LIEBICH, B. W.; PARTHE, E. 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone. **Acta Crystallographica Section B**, v. 30, n. 10, p. 2522-2524, 1974.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. Interpretação de análise de solo. 2004. Disponível em: < http://www.anda.org.br/boletins/Boletim_02.pdf >. Acesso em: 28 fev 2012.

LOWE, N. J. An Overview of Ultraviolet Radiation, Sunscreens, and Photo-Induced Dermatoses. . **Dermatol Clin**, v. 24, p. 9-17, 2006.

MAES, A.; STUL, M. S.; CREMERS, A. Layer charge--cation-exchange capacity relationships in montmorillonite. **Clays and Clay Minerals**, v. 27, n. 5, p. 387-392, October 1, 1979 1979.

MAMBRO, V. M. D.; FONSECA, M. J. V. Mudanças por Radicais Livres e Ação Tópica de Antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries Brasil**, v. 19, n. 5, p. 74-76, 2007.

MELO, R. G.; LEITAO, A. C.; PADULA, M. Role of OGG1 and NTG2 in the repair of oxidative DNA damage and mutagenesis induced by hydrogen

peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: relationships with transition metals iron and copper. **Yeast**, v. 21, n. 12, p. 991-1003, Sep 2004.

MÉNESI, J.; KÖRÖSI, L.; BAZSÓ, É. et al. Photocatalytic oxidation of organic pollutants on titania–clay composites. **Chemosphere**, v. 70, n. 3, p. 538-542, 2008.

MICHALUN, N.; MICHALUN, M. V.; SILVA, M. **Dicionário de ingredientes para cosmética e cuidados da pele - Tradução da 3ª edição norte-americana**. Brasil: Ed. Senac São Paulo, 2011.

MIEHLICH, B.; SAVIN, A.; STOLL, H. et al. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. **Chemical Physics Letters**, v. 157, n. 3, p. 200-206, 1989.

MOLINA-MOLINA, J.-M.; ESCANDE, A.; PILLON, A. et al. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, n. 3, p. 384-395, 2008.

MOLONEY, F. J.; COLLINS, S.; MURPHY, G. M. Sunscreens: Safety, Efficacy and Appropriate Use **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 3, n. 3, p. 185-191, 2002.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 263-9, 2009

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; WIENCH, K.; LANDSIEDEL, R. et al. Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 264-280, September 1, 2011 2011.

MONTEIRO, M. S. S. B.; RODRIGUES, C. L.; NETO, R. P. C. et al. The structure of polycaprolactone-clay nanocomposites investigated by ¹H NMR relaxometry. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 9, p. 7307-7313, 2012.

NEVES, K. **Efeitos do sol sobre a pele**. Edição temática Rev. de negócios da indústria da beleza. São Paulo. 7 2008.

NEWMAN, M. D.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide– and zinc oxide–based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 4, p. 685-692, 2009.

NOHYNEK, G. J.; SCHAEFER, H. Benefit and Risk of Organic Ultraviolet Filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 285-299, 2001.

OKEREKE, C. S.; BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. **Toxicology Letters**, v. 80, n. 1–3, p. 61-67, 1995.

PAIVA, J. P.; LEITAO, A. C.; PADULA, M. et al. **Avaliação do potencial Oxidativo do Dióxido de Titânio (TiO₂) com uso de antioxidantes e substâncias fotoprotetoras para proteção solar**. DISSERTAÇÃO. não publicado 2013.

PAIVA, L. B. D.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v. 54, p. 213-226, 2008.

PAIVA, L. B. D.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros**, v. 16, p. 136-140, 2006.

PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 5, p. 360-376, 2007.

PALUSZKIEWICZ, C.; STODOLAK, E.; HASIK, M. et al. FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 4, p. 784-788, 2011.

PASSOS, A. A.; TAVARES, M. I. B.; NETO, R. C. P. et al. Preparation of EVA/SILICA nanocomposites characterized with solid state nuclear magnetic resonance. **Obtenção de nanocompósito de EVA/SÍLICA e caracterização por ressonância magnética nuclear no estado sólido**, v. 21, n. 2, p. 98-102, 2011.

PAUL, D. R.; ROBESON, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. **Polymer**, v. 49, n. 15, p. 3187-3204, 2008.

PAULA, D. P. **Aplicação de uma cumarina como sonda fluorescente e caracterização fotofísica e espectroscópica de três análogos de psoraleno em meios homogêneo e microheterogêneo**. . 2003. (Dissertação (Mestrado)). Instituto de química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; BERTINI, B. et al. Anionic clays for sunscreen agent safe use: Photoprotection, photostability and prevention of their skin penetration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 2, p. 185-193, 2006.

PINTO, A. V.; DEODATO, E. L.; CARDOSO, J. S. et al. Enzymatic recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for oxidatively

DNA damage generation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 688, n. 1–2, p. 3-11, 2010.

PLANTA, M. B. Sunscreen and Melanoma: Is Our Prevention Message Correct? **J Am Board Fam Med**, v. 24, p. 735–739, 2011.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

PROMKATKAEW, M.; SURAMITR, S.; KARPKIRD, T. M. et al. Absorption and emission spectra of ultraviolet B blocking methoxy substituted cinnamates investigated using the symmetry-adapted cluster configuration interaction method. **J Chem Phys**, v. 131, n. 22, p. 224306, Dec 14 2009.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. . 1. São Paulo: Pharmabooks, 2006. 269

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, p. 54-57, 2008.

ROWE, R. C. Handbook of pharmaceutical excipients. In: (Ed.). 6th Edition: Pharmaceutical Press, 2009. p.741-743. ISBN 0853697922, 9780853697923.

RUNGE, E.; GROSS, E. K. U. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. **Physical Review Letters**, v. 52, n. 12, p. 997-1000, 1984.

SADRIEH, N.; WOKOVICH, A. M.; GOPEE, N. V. et al. Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO₂ Particles. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 156-166, May 1, 2010 2010.

SARASWAT, K.; PRASAD, R. N.; RATNANI, R. et al. Synthesis, spectroscopic characterization and structural studies of mixed ligand complexes of Sr(II) and Ba(II) with 2-hydroxybenzophenone and salicylaldehyde, hydroxyaromatic ketones or β -diketones: Crystal structure of 2-HOC₆H₄C(O)C₆H₅. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 4, p. 1291-1295, 2006.

SCHLEMPER, E. Intramolecular hydrogen bonding in 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone. **Acta Crystallographica Section B**, v. 38, n. 2, p. 554-559, 1982.

SCHMIDT, M. W.; BALDRIDGE, K. K.; BOATZ, J. A. et al. General atomic and molecular electronic structure system **J Comput Chem**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1993.

SENZUI, M.; TAMURA, T.; MIURA, K. et al. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin <i>in

vitro</i>. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 1, p. 107-113, 2010.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A. Deleterious effects of sunscreen titanium dioxide nanoparticles on DNA: efforts to limit DNA damage by particle surface modification. p. 86-98, 2001.

SILVA, A. R. V.; FERREIRA, H. C. Esmectitas organofílicas: conceitos, estruturas, propriedades, síntese, usos industriais e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 3, p. 01-11, 2008.

SINGH, S. K.; SZULIK, M. W.; GANGULY, M. et al. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. **Nucleic Acids Res**, May 13, 2011 2011.

SOARES, K. C. C. **Avaliação do usos de bentonita sódica na preparação de nanosistemas com atividade biológica**. 2003. 133 (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOUZA, L. L. **Estudo do reparo das lesões induzidas pela radiação ultravioleta B (UVB) no DNA de Escherichia coli e Saccharomyces cerevisiae**. . 2009. 130 (Doutorado). Instituto de biofísica Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SUZUKI, T.; KITAMURA, S.; KHOTA, R. et al. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **J. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky**, v. 150, n. 1, p. 25-38, 2006.

TUCHINDA, C.; LIM, H. W.; OSTERWALDER, U. et al. Novel Emerging Sunscreen Technologies. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.

VAN DER VELDEN, G. P. M.; NOORDIK, J. H. Crystallographic and spectroscopic study of 4,4'-diaminobenzophenone. **journal of chemical crystallography**, v. 10, n. chemistry and materials science, p. 83-92, 1980.

VAZQUEZ, A.; LÓPEZ, M.; KORTABERRIA, G. et al. Modification of montmorillonite with cationic surfactants. Thermal and chemical analysis including CEC determination. **Applied Clay Science**, v. 41, n. 1–2, p. 24-36, 2008.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A. et al. **Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro)**

– **revisão.** 2011. Disponível em: < http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/1443/1051 >.

WALTERS, C.; KEENEY, A.; WIGAL, C. T. et al. The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens. **Journal Chemical Education**, v. 74, n. 1, p. 99-101, 1997.

WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the Era of Nanotechnology **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, n. 4, p. 210-213, 2011.

WATANABE, H.; SHIMIZU, T.; NISHIHARA, J. et al. Ultraviolet A-induced Production of Matrix Metalloproteinase-1 is Mediated by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Dermal Fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 3, p. 1676-1683, 2004.

WATERS, A. J.; SANDHU, D. R.; LOWE, G. et al. Photocontact allergy to PABA in sunscreens: the need for continued vigilance. **Contact Dermatitis**, v. 60, n. 3, p. 172-173, 2009.

WELLER, P.; FREEMAN, S. PHOTOCONTACT ALLERGY TO OCTYLDIMETHYL PABA. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 73-76, 1984.

WLASCHEK, M.; TANTCHEVA-POÓR, I.; NADERI, L. et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1–3, p. 41-51, 2001.

YOUNG, A. R. Acute effects of UVR on human eyes and skin. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 80-85, 2006.