



Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

Ana Claudia Nogueira Astrath

**ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA:
DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE DIFUSÃO DE
COMPLEXOS NANOENCAPSULADOS NA PELE E DE
FOTOSENSIBILIZADORES NA DENTINA**

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co-orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Graciette Matioli

Prof^a. Dr^a. Raquel Sano Suga Terada

Maringá, Julho de 2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A859 Astrath, Ana Claudia Nogueira
Espectroscopia fotoacústica : determinação das taxas de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotosensibilizadores na dentina. / Ana Claudia Nogueira Astrath. -- Maringá, 2011.
105 f. : il, color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso.
Co-orientadoras: Prof^a Dr^a Graciette Matioli e Prof^a Dr^a Raquel Sano Suga Terada.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física.

1. Espectroscopia Fotoacústica. 2. Permeação. 3. Benzofenona-3. 4. Ciclodextrina. 5. Fotossensibilizadores. 6. Cárie dentária. 7. Terapia fotodinâmica. I. Baesso, Mauro Luciano, orient. II. Matioli, Graciette, co-orientadora. III. Terada, Raquel Sano Suga, co-orientadora. IV. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física. V. Título.

535.84 CDD 21.ed.
AHS-000604



Universidade Estadual de Maringá

Pós-Graduação em Física

Ana Claudia Nogueira Astrath

**ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA:
DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE DIFUSÃO DE
COMPLEXOS NANOENCAPSULADOS NA PELE E DE
FOTOSENSIBILIZADORES NA DENTINA**

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso

Co-orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Graciette Matioli

Prof^a. Dr^a. Raquel Sano Suga Terada

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Estadual de Maringá para a
obtenção do título de mestre em Física.

Maringá, Julho de 2011

Dedico este trabalho à pessoa mais importante da minha vida, de quem sempre recebo amor, carinho e principalmente compreensão e estímulo, o meu esposo Eduardo Astrath.

Também dedico este trabalho com muito carinho aos meus outros dois amores, meus pais, Cleide e José, que sempre estiveram ao meu lado quando precisei.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é o resultado de um verdadeiro trabalho em equipe, que não seria possível sem a importante colaboração de algumas pessoas, agradeço em especial:

- primeiramente a Deus, por mais esta bênção alcançada, e pelo conforto encontrado nas orações durante os momentos difíceis;
- ao meu orientador, Professor Mauro Luciano Baesso, por quem aprendi a ter imensa admiração. Sou muito grata pela paciência, estímulo, conhecimento adquirido e principalmente pela confiança em meu trabalho;
- à toda minha família que sempre me incentivou nos estudos em especial aos meus irmãos Sirley e Geniel, aos meus cunhados, Rita, Ademir, Francine e Nelson. Agradeço ainda a Ironcina e ao Luís por todo carinho e ajuda incondicional;
- à Fernanda Berbicz e à Ariane Ximenes, minhas companheiras de pesquisa. Sou grata a vocês meninas pela cooperação e confiança, mas principalmente pela amizade que se tornou tão importante para mim. Tenho a certeza de que ganhei duas grandes amigas;
- à Prof^a. Dr^a. Graciette Matioli do Departamento de Farmácia (UEM), por toda ajuda com o trabalho do protetor solar, atenção e paciência. Foi muito gratificante ter trabalhado com você, espero que possamos trabalhar juntas mais vezes;
- à Prof^a. Dr^a. Raquel S.S. Terada do Departamento de Odontologia (UEM) que sugeriu a realização do trabalho com os fotossensibilizadores. Agradeço por seus ensinamentos durante este tempo de convívio e pela afetuosa atenção;
- ao Valdirlei, pela ajuda nas medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- à Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandez, pela ajuda nas medidas de Microscopia Óptica;
- à Francielle Sato, Elizandra e Lidiane, por toda ajuda, tanto com os experimentos quanto pelas valiosas discussões dos resultados. Jamais me esquecerei de todo esse carinho e amizade;
- à Juliana Nagata e a Prof^a. Dr^a. Mitsue F. Hayacibara, do departamento de Odontologia (UEM), pela ajuda e participação efetiva na execução deste trabalho;
- aos meus eternos amigos, Jaciele, Leandro, Mayara e Taiana, por todo estímulo e compreensão, pelos tão saborosos cafezinhos da cantina, sem vocês tudo teria sido bem mais difícil;
- aos amigos, alfabeticamente ordenados: Andressa, Aline, Daniel, Elton, Giselly, Gustavo, Gutierrez, Marcelo, Márcio, Nilson e Vitor, pela ajuda, companheirismo, apoio e tantas outras coisas que sempre me ajudaram;
- aos Professores do Mestrado, por todo conhecimento e ensinamento. Obrigada pela paciência e disponibilidade em ensinar;

- aos Professores do GEF, pela colaboração, sugestões e importantes discussões;
- a todos os funcionários do DFI-UEM, e em especial à Akiko;
- à Capes, CNPq, Fundação Araucária e UEM pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada a todos!

Sumário

Resumo.....	10
Abstract	11
1 Introdução	12
1.1 Objetivos.....	14
2 Aspectos teóricos.....	16
2.1 Radiação e a matéria.....	16
2.2 Histórico do efeito fotoacústico.....	18
2.3 Efeito fotoacústico: definição	19
2.3.1 Comportamento óptico e térmico das amostras.....	19
3 Considerações sobre a técnica fotoacústica.....	24
3.1 A célula fotoacústica.....	24
3.1.1 O sinal fotoacústico	25
3.2 Método de separação dos espectros na fase do sinal fotoacústico	27
4 Considerações gerais	29
4.1 Parte I.....	29
4.1.1 Estrutura da pele	29
4.1.2 Rotas de permeação de substâncias na pele.....	30
4.1.3 A radiação ultravioleta e os efeitos sobre a pele.....	32
4.1.4 Proteção solar e a formação dos complexos nanoencapsulados	33
4.2 Parte II	40
4.2.1 Dentes	40
4.2.2 Cárie dentária e terapia fotodinâmica	42
4.2.3 Fotossensibilizadores	44
5 Procedimentos e montagens experimentais.....	48
5.1 Parte I.....	48
5.1.1 Preparação dos complexos de inclusão e do protetor solar	48
5.1.2 Modelo de estudo em animais	49
5.2 Parte II	50
5.2.1 Amostras de dentina	50
5.2.2 Fotossensibilizadores.....	52
5.3 Montagem experimental da espectroscopia fotoacústica	55

6	Resultados e discussão.....	57
6.1	Parte I – Complexos nanoencapsulados para proteção solar.....	57
6.1.1	Determinação da resposta espectral das formulações.....	57
6.1.2	Medidas <i>ex vivo</i> da difusão das formulações através pele.....	59
6.1.3	Método de separação de espectros na fase (MS ϕ).....	63
6.2	Parte II - Corantes e a permeabilidade dentinária.....	68
6.2.1	Espectros de absorção nas regiões espectrais do UV-VIS.....	68
6.3	Transmitância de luz através da dentina humana	88
6.3.1	Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura	93
7	Conclusões	97
8	Bibliografia.....	99

Resumo

Neste trabalho a Espectroscopia Fotoacústica foi utilizada para avaliar a taxa de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina. Os complexos nanoencapsulados são de interesse em várias áreas e neste trabalho foram utilizados na formulação de protetor solar e obtidos com a inclusão de benzofenona-3 (BZ-3) em hidroxipropil- β -ciclodextrina. A penetração percutânea das formulações de protetores solares com estes complexos ou com a (BZ-3) foi avaliada *ex vivo* utilizando-se pele de coelhos como modelo. Além disso, a fotoacústica foi empregada para se avaliar *in vitro* a permeabilidade dentinária de fotossensibilizadores (Azul de Metileno, Azul de *O*-toluidina e Verde de Malaquita) de interesse na terapia fotodinâmica. Neste último estudo foram realizadas medidas complementares com a espectroscopia fotoacústica no infravermelho por transformada de Fourier, com a Microscopia Eletrônica de Varredura e com a Microscopia Óptica. Os resultados mostraram que a formulação com o complexo nanoencapsulado apresentou menor penetração na pele se comparada à da formulação com (BZ-3). Esta observação foi reforçada a partir da análise da fase do sinal fotoacústico, que permitiu separar as contribuições para o espectro provenientes das bandas de absorção óptica das formulações daquelas da pele. Isto indica que o processo de nanoencapsulamento adotado pode ser uma alternativa na busca por novos protetores solares com menor taxa de difusão na pele e que ainda possam apresentar maior fotoestabilidade. No segundo estudo os resultados mostraram que os três fotossensibilizadores apresentaram alta taxa de permeação na dentina, inclusive quando o intervalo de tempo de aplicação foi da ordem de 1 min. Isto indica que em termos de taxa de difusão estes fotossensibilizadores são viáveis para uso prático na odontologia. Além disso, a partir destes resultados e do coeficiente de espalhamento de luz na dentina, propusemos um modelo semi quantitativo que permite prever a concentração do fotossensibilizador e a intensidade de luz nas diferentes profundidades ao longo da dentina. Este modelo parece ser de grande valia para o aprimoramento dos protocolos utilizados na terapia fotodinâmica de interesse na odontologia. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostraram mais uma vez que a espectroscopia fotoacústica é uma técnica muito importante para se determinar a penetração e a distribuição de formulações em sistemas biológicos, que em geral não são possíveis de serem obtidas com outros métodos.

Abstract

In this work the Photoacoustic Spectroscopy technique was applied to measure the diffusion rate of both nanoencapsulated complexes through the skin and photosensitizers through the dentin. The nanoencapsulated complexes are of interest in several areas and in this work were used in the sunscreen formulations and were obtained with the inclusion of benzophenone-3 (BZ-3) in hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The percutaneous penetration of the formulations of sunscreens with these complexes or with (BZ-3) was *ex vivo* evaluated using rabbit skin as the model. In addition, in an *in vitro* study and of interest for the photodynamic therapy, the photoacoustic method was applied for the evaluation of three photosensitizers (Methylene Blue, Toluidine Blue *O* and Malachite Green) penetration rate through the human dentin. In the latter study, complementary measurements with Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy, Electron Scanning Microscopy and Optical Microscopy were also performed. The results showed that the formulation with nanoencapsulated complexes presented lower penetration rate through the skin when compared with that of the formulation with (BZ-3). This observation was reinforced after the analysis of the phase of the photoacoustic signal, that permitted to resolve the total spectrum, providing the optical absorption bands attributed to the formulation or the skin. This indicates that the obtained nanoencapsulated complexes may be an alternative route in the search for new sunscreen formulations with reduced diffusion rates through the skin, probably presenting higher photostability. In the second study, the results showed that the three photosensitizers presented high penetration rate through the dentin, even when the application time interval was on the order of 1 min. This means that in terms of diffusion rates these photosensitizers are promising for practical use in the dentistry. In addition, with this result and using literature values for the dentin light scattering coefficients, we proposed a semi quantitative model predicting both photosensitizers concentration and incident light intensity along with the dentin thickness. This model may help to perform improvements in the used photodynamic therapy protocols of interest in the dentistry. In conclusion, the results of this work showed once again that the photoacoustic spectroscopy is an important technique to determine the penetration and distribution of formulations in biological systems, what generally can not be obtained with other methods.

Introdução

O desenvolvimento de fotoprotetores ou filtros solares data de 1930, quando as primeiras formulações para proteção contra a radiação ultravioleta (RUV) foram obtidas ^[1]. Desde então o uso de protetor solar tem sido recomendado como uma medida preventiva para proteger a população contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta.

É reconhecido atualmente que os mecanismos que descrevem a interação e a distribuição de substâncias aplicadas topicamente na pele não são bem entendidos. Isto porque a pele tem estrutura complexa que varia entre indivíduos e devido a fatores como condições de umidade e nível de exposição solar ^{[2] [3]}.

Um filtro solar deve cobrir e proteger a pele. São desenvolvidos para terem atividades na superfície do tecido cutâneo, estrato córneo, ou seja, não apresentar absorção sistêmica. Além disso, não deve apresentar degradação dos componentes absorvedores de luz porque isto pode diminuir a capacidade de proteção solar e também produzir reações alérgicas ou tóxicas ^[4]. Todos esses fatores são extremamente importantes, uma vez que estas formulações são frequentemente aplicadas e espalhadas em grandes áreas do corpo ^[4].

A benzofenona-3 (BZ-3) é um dos compostos mais utilizados para absorver a radiação UV ^[5]. Ela é sólida na temperatura ambiente e pouco solúvel em preparações cosméticas ^[6]. É relativamente barata e capaz de absorver a radiação UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm). Um dos problemas é que a benzofenona pode permear através da pele e atingir a corrente sanguínea após aplicação tópica ^[7]. Estudos têm detectado BZ-3 na urina humana, no leite materno e no plasma do

sangue. Estes estudos mostraram ainda que este composto pode induzir reações adversas intensas na pele, como as fotodermatites [7]-[9].

A taxa de permeação de uma dada formulação na pele depende das propriedades de seus componentes e da integridade da pele. Várias estratégias têm sido usadas com a finalidade de reduzir a penetração sistêmica de protetores solares. Entre elas destacam-se a escolha adequada da formulação da base a ser utilizada para dispersar o princípio ativo, o uso de nanopartículas nas formulações, entre outras [10][11].

Na área farmacêutica, as ciclodextrinas (CDs) têm sido uma estratégia eficaz para aumentar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos. Também são usadas para eliminar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos [12][13]. A CD é amplamente utilizada para formar complexos de inclusão com vários substratos orgânicos [14]. Mais de 30 medicamentos comercializados contam com a presença de ciclodextrinas em suas formulações [12].

Estudos mostraram que a complexação de benzofenona com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) aumenta a solubilidade e a fotoestabilidade de protetores solares e reduz a penetração da BZ-3 através da membrana biológica, sem suprimir suas propriedades de absorção da RUV [10][15][16].

Diversas técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas para se avaliar a penetração e a distribuição de substâncias através da pele. Entre elas a Espectroscopia Fotoacústica (PAS) tem sido um método importante nessa área, possibilitando a realização destes estudos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Esta técnica é caracterizada por ser não destrutiva e por ser adequada para estudos de materiais opacos, pouco absorvedores, géis, pós, etc. Além disso, ela permite que se realize análise do perfil de profundidade de substâncias distribuídas ao longo da espessura da amostra. Para as análises de produtos para proteção solar, a PAS viabiliza a detecção de suas bandas de absorção óptica nas regiões espectrais do UVA e do UVB, que são radiações com comprimentos de onda que podem induzir danos na pele. Não há relatos na literatura sobre o uso da espectroscopia fotoacústica para se avaliar a penetração cutânea do complexo de inclusão entre BZ-3 e (HP- β -CD).

O segundo tópico de interesse neste trabalho se refere ao estudo da difusão de fotossensibilizadores para uso na terapia fotodinâmica (PDT) na odontologia. A PDT tem sido empregada para descontaminação da dentina cariada, atuando como coadjuvante no tratamento da cárie por meio da inativação de até 95% de seus

microrganismos^[17]. Nesta técnica um fotossensibilizador é ativado por uma radiação de determinado comprimento de onda (para o qual a absorção do fotossensibilizador seja máxima), resultando na geração de espécies citotóxicas, incluindo oxigênio singlete e radicais livres, que são capazes de exercer efeito bactericida^{[17][18]}.

Os corantes fenotiazinas, azul de metileno (MB) e azul de orto-toluidina (TBO) são agentes fotossensibilizadores que vêm sendo empregados na PDT para inativação de organismos patogênicos, como vírus e bactérias^[19]. Inúmeros estudos têm relatado esse efeito bactericida dos fotossensibilizadores contra microorganismos cariogênicos presentes na cavidade bucal, como o *Streptococcus mutans*^{[17][18][20][21]}. Outro composto que pode ser utilizado como fotossensibilizador é o verde de malaquita (MG), um corante catiônico da família dos trifenilmetanos, que já é utilizado na rotina odontológica como evidenciador da placa bacteriana^[22].

Para se obter resultados satisfatórios na PDT é necessário que ocorra a permeabilidade dentinária dos fotossensibilizadores utilizados nesse tratamento. Isto porque se não houver permeação na dentina, o efeito da PDT será superficial. Como não foram encontrados relatos na literatura sobre medidas da permeabilidade dentinária de fotossensibilizadores na dentina, mais uma vez a espectroscopia fotoacústica parece ser a técnica adequada para se realizar este estudo.

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é utilizar a espectroscopia fotoacústica para avaliar a taxa de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina.

Objetivos específicos:

- avaliar a resposta espectral dos complexos de inclusão entre BZ-3 e HP- β -CD;
- determinar *ex vivo* a penetração cutânea, em peles de coelhos, de protetores solares obtidos com estes complexos;
- aplicar o método de separação dos espectros na fase do sinal fotoacústico para identificar a presença dos componentes da formulação na pele;

- avaliar *in vitro* a permeabilidade dentinária dos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de *o*-toluidina e verde de malaquita, empregados na terapia fotodinâmica;

Capítulo 2

Aspectos teóricos

2.1 Radiação e a matéria

A espectroscopia é a área da ciência dedicada ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Comprimentos de onda distintos transportam diferentes quantidades de energia resultando em interações que podem ser analisadas para se obter informações sobre as características da estrutura molecular dos compostos e suas possíveis funcionalidades ^{[23] [24]}.

A radiação eletromagnética pode ser tratada classicamente como de caráter ondulatório. Cada onda pode ser caracterizada por um comprimento de onda, conforme ilustrado na Figura 2.1. Na ordem crescente de energia, mostra-se desde as ondas de rádio até radiações de alta energia como os raios-X e os raios- γ ^{[25][26]}.

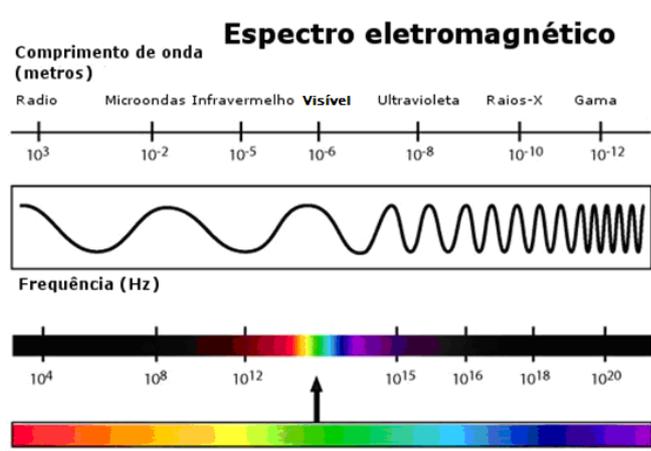


Figura 2.1 – Representação esquemática o espectro eletromagnético ^[27].

Embora não haja uma definição específica dos limites entre cada região espectral, suas denominações auxiliam na caracterização e no processo de entendimento dos mecanismos de interação de cada radiação com a matéria.

As frequências da região do visível correspondem a menos do que 1% de todo o espectro eletromagnético, cujo comprimento de onda está compreendido entre 400 e 700 nm. A radiação ultravioleta está compreendida entre 200 e 400 nm. As radiações do visível e do ultravioleta podem induzir excitações nos materiais a partir de transições de determinados elétrons de seu respectivo estado de menor energia para outros de maior energia ^{[23][28]}.

Quando a radiação com um determinado comprimento de onda interage com a matéria, ocorrerá algum fenômeno espectroscópico, como por exemplo, absorção, transmissão, reflexão, espalhamento, entre outros, que dependerão da energia da radiação incidente e do meio material considerado ^[23]. Em geral, os estudos espectroscópicos são tão eficientes para revelar as propriedades de um meio que suas informações podem ser consideradas como uma impressão digital do sistema em estudo.

Espectros eletrônicos refletem transições entre os níveis rotacionais dos vários níveis vibracionais de um estado eletrônico e os níveis rotacionais e vibracionais de outro estado eletrônico. Isto é chamado de sistema de bandas. Ele contém todas as bandas vibracionais da transição eletrônica em observação, cada uma com sua estrutura rotacional. Em geral todos os três números quânticos mudam nessas transições: J e v , e mais aquele que caracteriza o estado eletrônico (n , l , m_l ou j e m_j) ^[28].

O alargamento das bandas de absorção ocorre quando várias transições com diferentes energias estão presentes, ou seja, quando os níveis de energia vibracional e rotacional estão superpostos aos níveis eletrônicos ^[29].

A análise do processo de interação entre radiação eletromagnética e a matéria é o que chamamos de espectroscopia. O espectro é o registro dessa interação. Dependendo da radiação interagente pode-se recorrer a uma técnica espectroscópica específica. De interesse especial para esse trabalho destacamos as regiões espectrais do ultravioleta e do visível, nas quais a espectroscopia fotoacústica apresenta-se como uma técnica viável e de extremo valor para se obter os espectros de absorção óptica e o perfil de profundidade, na amostra, das formulações ou compostos utilizados.

2.2 Histórico do efeito fotoacústico

Alexandre Graham Bell descobriu o efeito fotoacústico em 1880. Ele observou que efeitos sonoros podiam ser ouvidos quando um feixe de luz solar modulado incidia sobre um sólido posicionado em uma câmara fechada ^[30]. A Figura 2.2 ilustra a montagem do experimento, por ele denominada de fotofone.

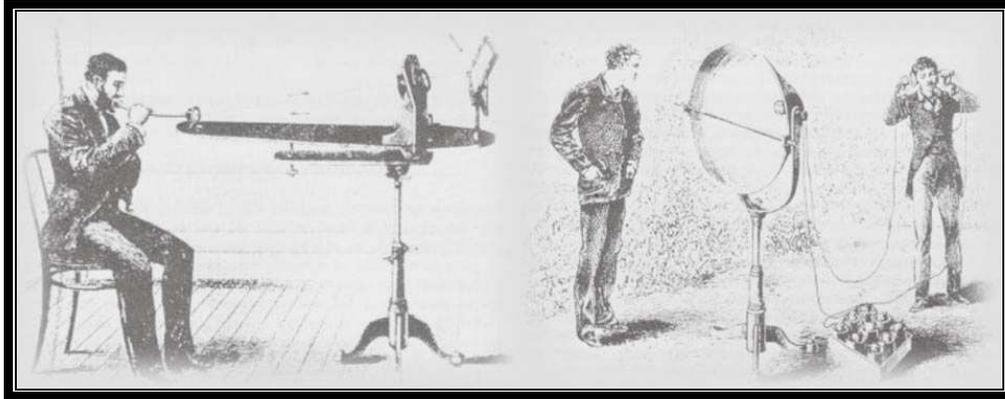


Figura 2.2 – Foto da montagem experimental de Graham Bell ^[31].

Bell fez experimentos subseqüentes com uma variedade de sólidos, líquidos e gases. Ele observou que os efeitos sonoros induzidos dependiam da natureza das substâncias expostas à radiação e ainda do respectivo comprimento de onda utilizado. Seu trabalho despertou grande interesse na época ^[30].

Em 1973, Allan Rosencwaig e Allen Gersho desenvolveram o modelo teórico para descrever o efeito fotoacústico gerado em amostras sólidas. Neste modelo eles obtiveram como resultado equações analíticas que permitiam determinar as propriedades ópticas e térmicas das amostras. Desta forma, a espectroscopia fotoacústica tornou-se uma ferramenta valiosa para o estudo de materiais. Entre outros fatores, os autores destacaram a possibilidade do método permitir a realização de análise do perfil de profundidade de centros absorvedores distribuídos ao longo da espessura das amostras ^{[25][29][30]}.

O modelo permitia a utilização de equações analíticas para descrever o comportamento do sinal fotoacústico tanto em termos da potência de luz incidente, como da frequência de sua modulação. Em seus experimentos, eles demonstraram que o sinal fotoacústico era o resultado do fluxo periódico de calor, induzido após a incidência de luz, entre a superfície da amostra e o gás contido na célula fotoacústica. Tratava-se, portanto, de um fenômeno fototérmico ^{[29][31]}.

2.3 Efeito fotoacústico: definição

O efeito fotoacústico consiste na geração de uma onda acústica e pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra posicionada dentro de uma célula fechada contendo gás, que pode ser o próprio ar. A incidência da luz e sua consequente absorção resultam em excitação dos níveis de energia da amostra. Como consequência ocorrerá relaxação, que se for não radiativa, induzirá geração de calor no material. Ao se utilizar excitação modulada, este aquecimento torna-se periódico, gerando uma onda de pressão no gás em contato com a amostra. Um microfone acoplado na câmara fotoacústica detecta esta variação da pressão, produzindo o sinal fotoacústico. Sua intensidade depende da frequência de modulação da luz incidente.

Portanto, o sinal fotoacústico é o resultado da interação da radiação com a matéria. Sua natureza é definida pelas propriedades ópticas e térmicas das amostras. A obtenção de espectros de absorção óptica gerados a partir do sinal fotoacústico caracteriza a técnica Espectroscopia Fotoacústica.

2.3.1 Comportamento óptico e térmico das amostras

Um determinado material pode não absorver totalmente um feixe de luz que incide sobre ele. Da parte absorvida, uma fração interage imediatamente com as moléculas da superfície do material e o restante é absorvido gradativamente, interagindo com as camadas moleculares cada vez mais profundas. A penetração da radiação ao longo da espessura da amostra ocorre de tal forma que a intensidade do feixe incidente diminui exponencialmente, conforme prevê a Lei de Beer ^[32]. A distância de penetração do feixe na amostra até sua intensidade ser reduzida a 1/e caracteriza a absorção óptica do material. O parâmetro que mede essa absorção é denominado de comprimento de absorção óptica, l_β , que é definido como: $l_\beta = 1/\beta$, sendo β o coeficiente de absorção óptica do material.

A Figura 2.3 mostra as três classificações que uma dada amostra pode receber em termos do seu comprimento de absorção óptica, l_β , e de sua espessura, l_s .

Se $l_\beta \ll l_s$: amostra opticamente opaca;

Se $l_\beta \approx l_s$: amostra absorvedora;

Se $l_\beta \gg l_s$: amostra opticamente transparente.

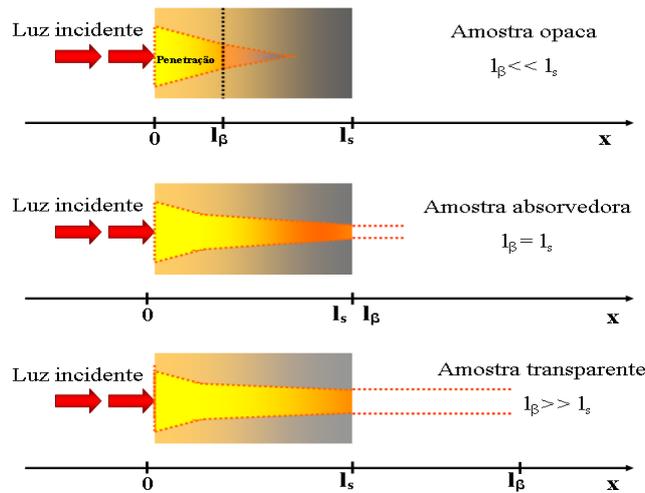


Figura 2.3 – Classificação do comportamento óptico das amostras.

Uma vez classificada a amostra em termos do comprimento de absorção óptica, é necessário estabelecer como o calor gerado pode contribuir para o aumento de pressão na célula, ou seja, para a geração do sinal fotoacústico. Atualmente, sabe-se que o sinal fotoacústico pode ser gerado por pelo menos quatro mecanismos principais, sendo eles: difusão térmica, expansão térmica, efeito termoelástico e efeito fotobárico.

Difusão Térmica: Neste processo, a incidência da luz modulada sobre a amostra produz um fluxo térmico no interior da mesma até o gás circundante, provocando neste uma variação de temperatura com a mesma frequência de modulação da luz incidente, como mostra a Figura 2.4. Neste caso, apenas uma fina camada do gás, a que está próxima à interface amostra-gás, é que responde termicamente às flutuações de temperatura da amostra. Esta camada de gás passará a expandir e contrair periodicamente funcionando como um pistão, gerando uma onda de pressão no interior da câmara fechada. O sinal fotoacústico resultará desta variação de pressão, que pode ser detectado por um microfone acoplado à célula. Este sistema é conhecido como modelo de pistão simples.

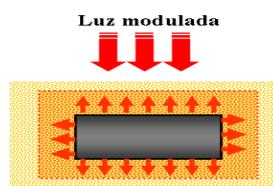


Figura 2.4 – Difusão térmica.

Expansão Térmica: Neste mecanismo, a própria amostra se expande e contrai devido ao aquecimento periódico causado pela absorção da luz modulada, como ilustrado na Figura 2.5. Deste modo o movimento da superfície da amostra atua sobre a coluna de gás gerando nele uma onda acústica. Neste caso, a intensidade do sinal é governada pelo coeficiente de expansão térmica do material. Em geral este mecanismo é dominante quando a amostra é de um material que apresenta alto valor para o coeficiente de expansão térmica.

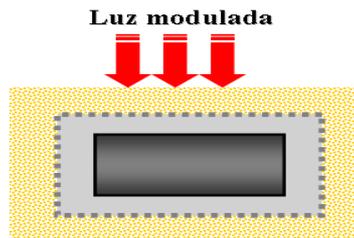


Figura 2.5– Expansão térmica.

Flexão Termoelástica: Este processo acontece quando há formação de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra. Este gradiente é gerado devido ao decréscimo da absorção à medida que a luz penetra no material. Isto faz com que a expansão térmica seja diferente para diferentes planos da amostra (perpendiculares ao gradiente), o que induz uma flexão. Em especial isto ocorre quando as bordas da amostra estão presas, conforme ilustra a Figura 2.6. Este processo é também periódico, gerando ondas de pressão no gás e conseqüentemente sinal fotoacústico.

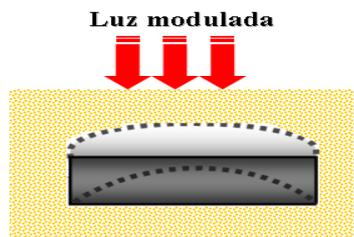


Figura 2.6 – Flexão termoelástica.

Efeito Fotobárico: Este efeito é observado em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica. É o que acontece, por exemplo, com folhas de plantas que liberam oxigênio quando realizam fotossíntese, conforme ilustrado na Figura 2.7.

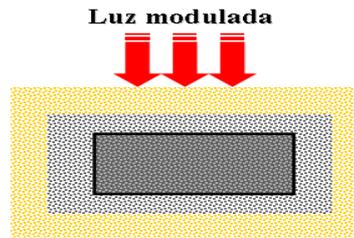


Figura 2.7 – Efeito fotobárico.

O comprimento de difusão térmica, μ_s , tem unidade de comprimento (cm), e é definido pela expressão (2.1):

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D}{\pi f}} \quad (2.1)$$

em que D é a difusividade térmica (cm^2/s) e f é a frequência de modulação (Hz) do feixe de luz incidente. Escolhida uma dada frequência de modulação para o experimento, este parâmetro fornece a camada da amostra (no lado da incidência de luz) que a radiação absorvida e convertida em calor contribui para a geração do sinal fotoacústico.

Classificação térmica: classificam-se termicamente as amostras a partir da comparação de sua espessura (l_s) com o comprimento de difusão térmica (μ_s):

- Se $\mu_s \gg l_s$: amostra termicamente fina;
- Se $\mu_s \ll l_s$: amostra termicamente grossa.

É importante ressaltar que uma amostra opaca pode ter seu espectro resolvido, desde que $\mu_s < l_s$. Na fotoacústica, uma amostra é considerada saturada se toda luz absorvida gera sinal acústico. A saturação pode ser contornada diminuindo-se as dimensões da amostra (tornando-a não opaca), ou aumentando-se a frequência de modulação (o que reduz o valor de μ_s). Isto porque com o aumento da frequência o sinal é gerado em camadas cada vez mais superficiais. Assim, com a dependência do comprimento de difusão térmica, μ_s , com a frequência de modulação, é possível efetuar uma análise do perfil de profundidade no material. Ou seja, é possível obter espectros de absorção óptica das diferentes camadas da amostra em estudo.

A Figura 2.8 mostra um esboço do perfil de penetração numa amostra, ilustrando o que ocorre se a frequência angular de modulação da luz (ω) é modificada. As setas representam as profundidades até onde o sinal PA é gerado, para a respectiva frequência de modulação. Nesta figura, a frequência cresce a partir de ω_1 até ω_6 .

Quanto menor a frequência de modulação da luz maior será a profundidade de geração do sinal fotoacústico.

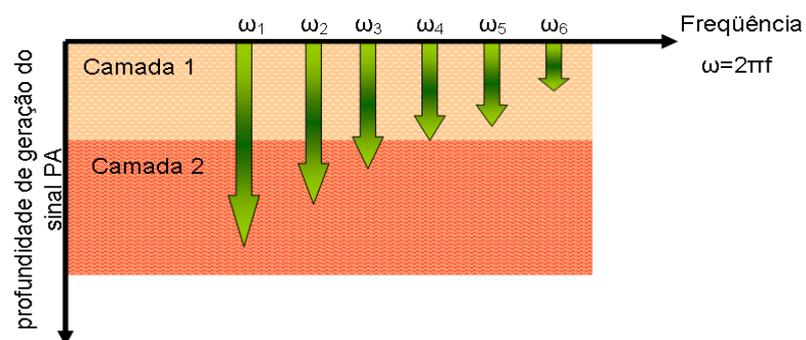


Figura 2.8 – Diagrama do perfil de profundidade na geração do sinal fotoacústico.

Capítulo 3

Considerações sobre a técnica fotoacústica

3.1 A célula fotoacústica

A configuração unidimensional padrão da célula fotoacústica esta representada na Figura 3.1.

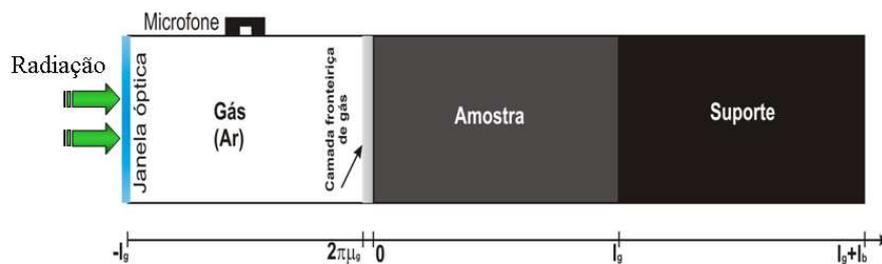


Figura 3.1 – Geometria da célula fotoacústica convencional ^[31].

Assume-se que o gás e o suporte da amostra não absorvam a luz. Para facilitar a descrição ao longo do texto, serão definidos alguns parâmetros físicos conforme mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros Fototérmicos.

Parâmetro	Denominação	Unidade (CGS)
l_s	Espessura da amostra	cm
l_b	Espessura do suporte	cm
l_g	Espessura do gás	cm
k_i	Condutividade térmica	cal/s.cm °C

ρ_i	Densidade de massa	g/cm^3
c_i	Calor específico	J/g.K
$\alpha_i = k_i/\rho_i c_i$	Difusividade térmica	cm^2/s
$a = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$	Coefficiente de difusão térmica	cm^{-1}
$\mu_i = 1/a_i$	Comprimento de difusão térmica	cm
$\sigma_i = (1+j)a_i$	Coefficiente complexo de difusão térmica	cm^{-1}
B	Coefficiente de absorção óptica	cm^{-1}
H	Eficiência de conversão luz-calor	adimensional
R	Coefficiente de reflexão da luz incidente na superfície	adimensional
$l_\beta = 1/\beta$	Comprimento de absorção óptica	cm

3.1.1 O sinal fotoacústico

O sinal fotoacústico é gerado pela variação de pressão do gás no interior da célula. No caso em que a coluna de ar é termicamente grossa, ou seja, $l_g > 2\pi\mu_g$ (aqui g especifica o gás), a intensidade do sinal fotoacústico torna-se bem reduzida, tendendo a se anular. A máxima intensidade do sinal é obtida quando $l_g \approx \mu_g$. Um fato importante é que o sinal fotoacústico é processado por um analisador síncrono, o Lock-in, que sincroniza os sinais elétricos provenientes do microfone e do modulador da luz. Isto significa que o sinal processado é a componente não temporal da variação da pressão na célula, sendo composto por uma intensidade $S_f = \left\| \tilde{S}_f \right\|$ e uma

fase $\Phi = \arctan \left[\frac{\text{Im}(\tilde{S}_f)}{\text{Re}(\tilde{S}_f)} \right]$. A fase é o atraso temporal entre o sinal elétrico do modu-

lador (referência que define o instante da incidência da radiação na amostra) e o sinal proveniente do microfone. Este atraso está ligado com o intervalo de tempo entre o instante em que ocorre a absorção da radiação pela amostra até aquele instante no qual a variação de pressão no gás é detectada pelo microfone. Em outras palavras, está ligado ao valor do tempo de relaxação não radiativa do centro absorvedor na

amostra. Assim, o sinal fotoacústico pode ser representado por um fasor no plano complexo, como mostra a Figura 3.2.

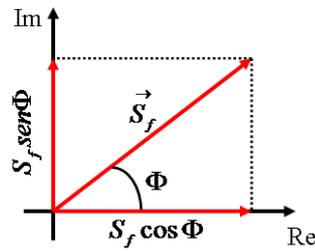


Figura 3.2 – Representação fasorial do sinal fotoacústico.

Em que

$$\tilde{S}_f = S_f e^{j\Phi_f} \quad (3.1)$$

A amplitude e a fase são os principais parâmetros em medidas experimentais com a fotoacústica. A intensidade do sinal depende linearmente da potência luminosa e do inverso do comprimento da coluna de gás. O sinal depende ainda do comprimento de onda utilizado e da frequência de modulação com que esta radiação chega até o material a ser estudado. O caráter modulado da radiação influencia diretamente a intensidade do sinal, via comprimento de difusão térmica, μ_s . Por outro lado, a fase do sinal fotoacústico independe da potência incidente. Ela é diferente para cada comprimento de difusão térmica, μ_s , variando com a profundidade onde há geração de calor. Além disso, ela depende do tempo de relaxação não radiativa de cada centro absorvedor na amostra.

O Método de Separação de Espectro na Fase do Sinal Fotoacústico ($MS\phi$) permite realizar decomposição dos espectros de absorção óptica a partir de um procedimento denominado de resolução dos espectros na fase do sinal fotoacústico. Este método tem sido utilizado para melhorar a resolução das bandas de absorção óptica provenientes de centro absorvedores diferentes na amostra. Uma vez que ele será empregado na análise dos resultados deste trabalho, faremos a seguir uma breve descrição dos seus princípios básicos.

3.2 Método de separação dos espectros na fase do sinal fotoacústico

O método de separação de espectros na fase do sinal fotoacústico ($MS\phi$) é adequado para o estudo de amostras que têm mais de um centro absorvedor (uma amostra com duas camadas ou composta de mais de uma substância, por exemplo). Cada um desses centros, absorvendo em comprimentos de onda diferentes, levará intervalos de tempo diferentes para absorver a radiação e gerar calor, apresentando assim sinais fotoacústicos com fases distintas. Como na medida experimental estas duas contribuições em geral estão misturadas, é possível fazer a deconvolução espectral [33]-[36]. Isto pode ser feito considerando-se as fases dos sinais S_A e S_B de cada camada ou de cada centro absorvedor A e B, respectivamente. Ou seja, há uma diferença de fase ψ entre os dois sinais [33]-[36].

A intensidade S_f e a fase ϕ do sinal fotoacústico são medidas por dois sinais em quadratura S_0 e S_{90} , que por convenção estão nas fases 0° e 90° . Como o sinal fotoacústico pode ser representado por um fasor, conforme mostrado na Figura 3.3 (a), temos:

$$S_f^2 = S_0^2 + S_{90}^2 \tag{3.2}$$

Com a fase podendo ser escrita como:

$$\phi = \arctg \frac{S_{90}}{S_0} \tag{3.3}$$

Então o sinal observado (S_f) deve ser visto como a resultante de dois fasores com ângulo ψ entre eles, como mostra a Figura 3.3 (b), com $\psi = \phi_B - \phi_A$.

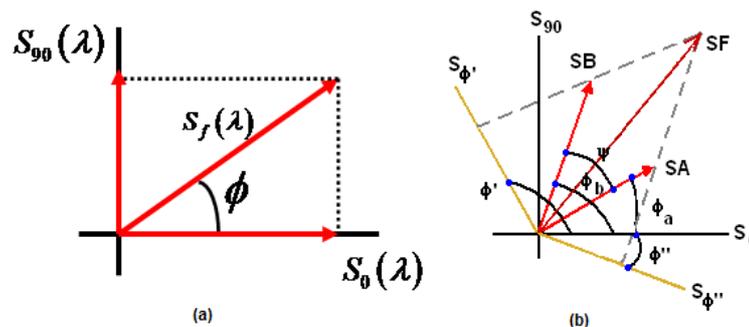


Figura 3.3 – a) Vetor do sinal fotoacústico (b) Composição do espectro em várias fases [35].

O método (MS ϕ) é baseado na utilização dos dois espectros em quadratura para cada comprimento de onda da medida, $S_0(\lambda)$ e $S_{90}(\lambda)$. Pode-se realizar com ele a composição de espectros para várias fases $\theta(\lambda)$, a partir da relação:

$$S_\theta = S_0(\lambda)\cos\theta + S_{90}(\lambda)\text{sen}\theta \quad (3.4)$$

As projeções em quadratura estão representadas na Figura 3.4.

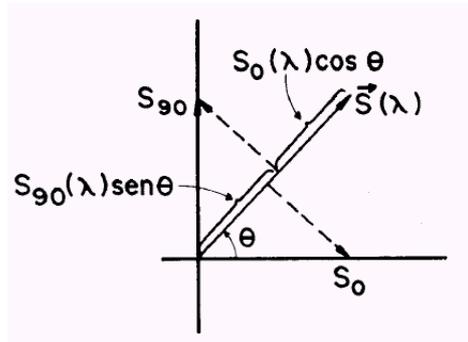


Figura 3.4 – Diagrama vetorial representando os componentes do sinal fotoacústico ^[36].

Quando o centro absorvedor A é minimizado no ângulo ϕ' , ou seja, maximizado em $\phi_A = \phi' \pm 90^\circ$, o espectro do centro B ou parte de sua projeção podem ser isoladas em ϕ' . Assim, o centro B será encontrado em $\phi_B = \phi'' \pm 90^\circ$ e o espectro do centro A ou parte de sua projeção podem ser isoladas em ϕ'' [Figura 3.3(b)].

A determinação de ϕ_A e ϕ_B , para picos de absorção A e B localizados em comprimentos de onda distintos, pode ser feita isolando-se o espectro, via projeção em um diagrama fasorial. O erro instrumental para a medida experimental da fase de um componente espectral é menor do que 1° . Por outro lado, para ser possível realizar separação espectral em espectros gerados por duas camadas adjacentes ou por dois centros absorvedores, o atraso na fase medida deve ser maior do que o da instrumentação. Em trabalhos anteriores observou-se que com uma diferença de fase $\psi > 5^\circ$ a separação espectral pôde ser realizada.

Este método foi empregado na primeira parte deste trabalho para se realizar separação espectral das bandas de absorção óptica das substâncias da formulação do fotoprotetor e as da pele.

Considerações gerais

Neste capítulo serão apresentadas algumas características dos complexos nanoencapsulados, da pele, dos fotossensibilizadores e da dentina, de modo a facilitar a análise dos resultados.

4.1 Parte I

4.1.1 Estrutura da pele

Considera-se a pele como um órgão multifuncional, muito complexo, resistente, flexível e bastante impermeável que, moldando e revestindo o corpo, o protege do meio exterior ^[5]. Por sua inervação, vascularização e presença de neuromediadores, a pele é muito importante pelas inúmeras funções que desempenha, tais como: proteção, renovação e reparação, secreções sebáceas e sudoral, regulação da temperatura do corpo, absorção da radiação ultravioleta para a síntese de vitamina D, etc. ^[37].

Na composição química desse tecido o elemento mais importante é a água, com cerca de 70% da massa total. As substâncias de natureza protéica, como aminoácidos, proteínas (elastina, colágeno, melanina), azotados (ácidos graxos e uréia), representam 27.5% dos constituintes químicos da pele. Outros de importância são os lipídios que se subdividem em: lipídios simples como colesterol, lipídios complexos (ceramídeos, fosfolipídios) e ainda os lipídios de reserva. Destacam-se ainda os sais minerais, principalmente, o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio, o zinco, o ferro, o fósforo, o enxofre e o iodo ^[37].

Estruturalmente é constituída por duas partes principais, uma porção epitelial, a epiderme, e uma conjuntiva, a derme. Abaixo da derme está a hipoderme que apesar de ter a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas serve de suporte e união com órgãos adjacentes, como mostra a Figura 4.1 [38].

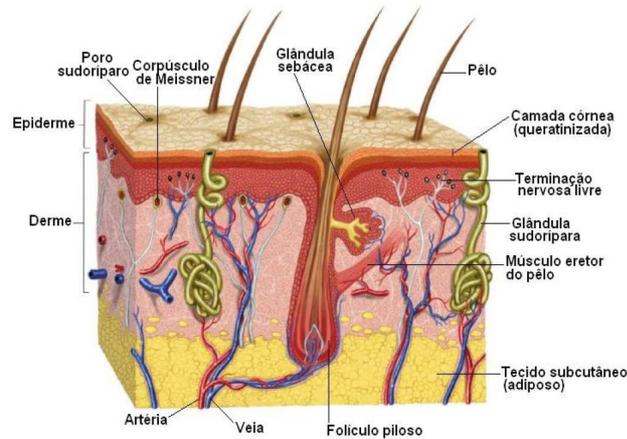


Figura 4.1 – Representação das camadas da pele e sua estrutura [39].

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, formado por camadas sobrepostas de células sendo a principal o queratinócito. Além desse epitélio, que constitui sua maior parte, há ainda três tipos de células: os melanócitos que produzem a melanina, pigmento que confere cor à pele e absorve os raios ultravioletas (UV); as células imunitárias, principalmente as de Langerhans (gigantes e com prolongamentos membranares); e por fim as células de Merkel [38][40]. A derme, camada de células vivas, oferece à pele força e volume, dando resistência, extensibilidade e elasticidade. Encontram-se neste tecido, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos, fibras, vasos sanguíneos, nervos e receptores da dor, tato, temperatura, etc [37].

4.1.2 Rotas de permeação de substâncias na pele

Quando uma molécula entra em contato com a superfície da pele há três rotas principais para a entrada nas camadas mais internas. Através dos folículos pilosos com glândulas sebáceas associadas, via ductos de glândulas sudoríparas e diretamente via estrato córneo [41]. As rotas possíveis estão ilustradas na Figura 4.2.

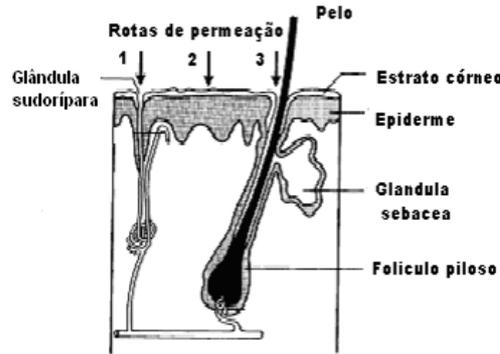


Figura 4.2 – Diagrama das rotas de permeação: (1) via glândulas sudoríparas, (2) através do estrato córneo e (3) via glândulas sebáceas e folículo piloso ^[41].

O estrato córneo representa a principal barreira dificultando a permeação de fármacos através da pele, podendo ser comparado a uma parede com estrutura de argamassa e tijolo como ilustra a Figura 4.3. Os corneócitos de queratina hidratados são representados pelos tijolos embebidos em um “cimento” constituído de múltiplas bicamadas lipídicas de ceramidas, ácidos graxos, colesterol e ésteres de colesterol ^[41]. A penetração de substâncias através do estrato córneo pode ocorrer através de duas rotas, a intercelular, considerada a principal via para a permeação de fármacos, em que as moléculas passam através da fase lipídica situada entre os corneócitos. E a rota transcelular que envolve passagens alternadas através dos corneócitos e lipídios o que dificulta a permeação por esta via ^{[4][41][42]}.

Os anexos como folículos pilosos glândulas sudoríparas e outros, também são importantes na permeação, principalmente para a passagem de íons e moléculas polares, pois os mesmos apresentam dificuldades para atravessar o estrato córneo intacto. No entanto, esses apêndices ocupam somente 0,1% da superfície total da pele humana e a contribuição dessa via para permeação é considerada pequena ^{[39][42]}.

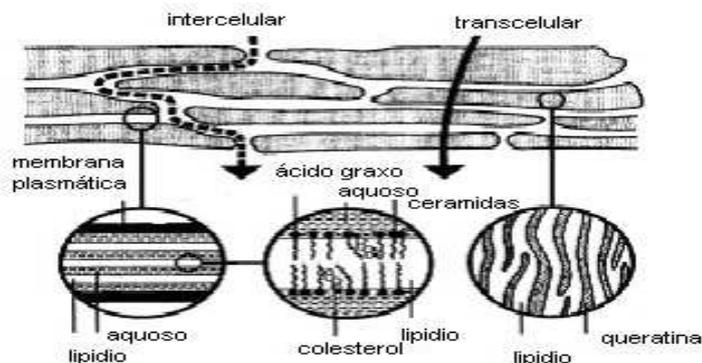


Figura 4.3 – Diagrama simplificado do estrato córneo e suas micro-rotas de penetração ^[41].

O estrato córneo compõe uma barreira importante na difusão de fármacos através da pele, podendo ser considerada como uma etapa limitante para a permeação das moléculas de fármacos. Algumas propriedades são de extrema importância para que as substâncias penetrem bem ao longo do estrato córneo, como baixo peso molecular, solubilidade adequada em água ou óleo, baixo ponto de fusão entre outras ^[41].

4.1.3 A radiação ultravioleta e os efeitos sobre à pele

A radiação ultravioleta (RUV), entre 200 e 400 nm, é subdividida em três regiões: UVA (320-400 nm), UVB (290-320) e UVC (200-290nm). A radiação UVA e UVB atingem a superfície da terra com intensidades que somadas representam aproximadamente 6% do total dos raios solares ^{[43][44]}. Nos organismos vivos a radiação UV pode induzir reações fotoquímicas. Elas estimulam a produção de melanina, inflamações, queimaduras, mutações genéticas, etc ^[45].

Ao atingir a pele parte da RUV é refletida e dispersada, outra fração é absorvida pelo estrato córneo e parte penetra através das demais camadas do tecido. São as radiações de menor energia que conseguem penetrar profundamente através da pele, como mostra a Figura 4.4. A radiação UVA por atingir a região da derme e transportar energia capaz de induzir a geração de radicais livres ou reações químicas, é a principal responsável pelo processo de fotoenvelhecimento. A radiação UVB é absorvida na superfície da pele com energia suficiente para induzir eritema, além de mutação celular ^{[4][5]}.

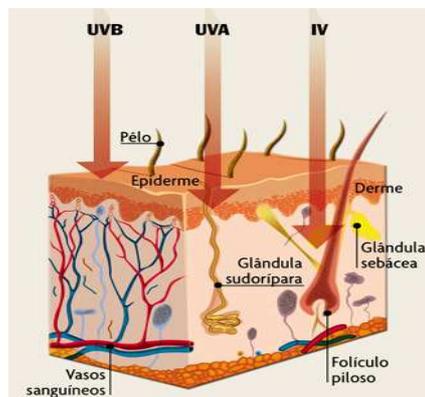


Figura 4.4 – Penetração da radiação UV e infravermelha (IV) na pele ^[46].

A indução de mutação celular, que pode resultar em câncer de pele, acontece quando o DNA é modificado pelas radiações UVA e UVB e seu reparo posterior não

acontece. Essas radiações atuam como mutagênicos por serem absorvidas pelo DNA. A radiação UVA é fracamente absorvida, porém cromóforos endógenos (melanina e hemoglobina) absorvem esse tipo de RUV formando espécies reativas de oxigênio que podem interagir e modificar o DNA ^{[4][5]}. É esta radiação que tem sido ligada à indução do melanoma.

A radiação UVB atinge principalmente a epiderme causando o eritema solar, um processo inflamatório, que se manifesta pela vermelhidão cutânea. Induz a formação de bolhas e o espessamento da derme e da epiderme ^{[4][5]}.

Os raios UVC são portadores de energias mais altas do que os UVA e UVB, característica que os tornam extremamente lesivos aos seres vivos. São absorvidos pelas camadas mais elevadas da atmosfera e a camada de ozônio reduz significativamente suas intensidades na superfície terrestre ^{[4][45]}.

4.1.4 Proteção solar e a formação dos complexos nanoencapsulados

A prevenção contra os efeitos causados pela RUV sobre a pele não é uma preocupação atual. Há muito tempo as civilizações vêm adotando procedimentos para se protegerem dos raios do sol ^[47]. No Egito antigo havia diversos inventos de filtro solar, entre eles os óleos de mamona e de amêndoa, além dos extratos de magnólia e jasmim. Na Grécia antiga os atletas utilizavam uma mistura de óleo de oliva e areia ^[48].

Em 1938, o estudante de química suíço Franz Greiter desenvolveu um filtro solar efetivo. Ele denominou seu produto de 'Creme Gletscher'. Amostras que ainda existem mostram que este produto tinha fator de proteção solar (FPS) 2 ^[49].

A história dos protetores solares modernos realmente começou durante a segunda guerra mundial, quando foram testados diversos materiais para proteção contra queimaduras solares sofridas pelos soldados que atuavam nos países tropicais. As preparações mais utilizadas continham ésteres, ácido para-aminobenzóico (PABA) e ácido para-dimetilaminobenzóico. O PABA é um composto praticamente insolúvel em água e é difícil de ser removido da pele mesmo com a prática de exercícios físicos. Isto fez com que ele fosse utilizado como protetor solar até recentemente ^[50].

Os protetores atuais visam proteger a pele tanto da radiação UVA quanto UVB, bem como oferecer uma boa aderência à epiderme e serem estáveis química-

mente. Isso porque o produto tem de permanecer por grande período de tempo na pele sem se degradar na presença de radiação. Não sendo quimicamente estável ele pode não apenas diminuir a capacidade de proteção solar durante a utilização, mas também produzir reações alérgicas ou tóxicas. Assim, a fotoestabilidade é um fator primordial nos estudos de proteção solar ^{[51][52]}.

Os filtros solares podem ser classificados como protetores físicos e químicos. Os filtros físicos são inorgânicos ou misturados com substâncias orgânicas, que refletem ou espalham as radiações UV e visível, funcionando como um filme opaco sobre a pele. Os compostos mais usados são o dióxido de titânio e o óxido de zinco, que têm alto índice de refração. Dependendo do tamanho da partícula, estes óxidos protegem contra a RUV, refletindo, espalhando ou absorvendo energia. No entanto, do ponto de vista estético são considerados indesejáveis por formar uma película branca sobre a pele. Formulações modernas desses filtros têm sido preparadas com micropartículas com dimensões que não absorvam e nem espalhem a radiação visível, mas apenas a RUV ^{[4][5][50]}.

Os protetores químicos (orgânicos) são geralmente compostos aromáticos conjugados com um grupo elétron-doador *para* ou *orto* e um grupo elétron-receptor. Essa estrutura química permite a deslocalização do elétron que pode mudar do grupo elétron-doador para o elétron-receptor, como ilustra a Figura 4.5. A energia necessária para a deslocalização do elétron corresponde à da radiação na região do UVB e do UVA ^{[50][53]}.

Nos filtros químicos a deslocalização do elétron causa uma excitação da molécula para um estado de maior energia enquanto absorve a radiação UV necessária para o processo. A molécula retorna para o estado fundamental emitindo uma energia menor do que a absorvida, gerando calor ou luminescência ^[53].

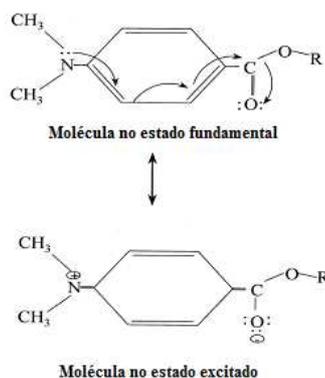


Figura 4.5 – Deslocalização do elétron, ao absorver radiação UV, para um filtro PABA ^[50].

Quando uma dissipação eficiente da energia não for possível, as ligações químicas da molécula absorvedora de UV podem quebrar, gerando radicais livres e novas ligações rapidamente podem ser formadas. Isto pode resultar em mudanças nas estruturas das moléculas ou mesmo em interações com a própria pele, o que pode causar danos à pele. Pode haver fotoreações reversíveis e irreversíveis. As irreversíveis definem a fotoinstabilidade da amostra ^[54].

Dentre os filtros químicos, aqueles obtidos a partir das benzofenonas são considerados fotoquimicamente mais estáveis. A oxibenzofenona, ou benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxi-fenila), é um filtro orgânico e é encontrado nos pigmentos das flores ^[55]. A BZ-3 (C₁₄O₃H₁₂), possui massa molar de 228,12 gmol⁻¹, ponto de fusão entre 62-64 °C. É solúvel em acetona, álcool etílico, álcool isopropílico e é insolúvel em água e em óleo mineral ^[45] ^[56]. Sua estrutura química está representada na Figura 4.6.

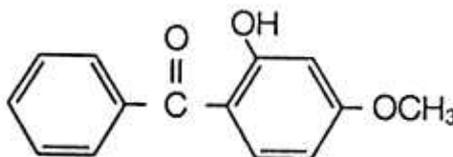


Figura 4.6 – Estrutura química da benzofenona-3 ^[56].

A BZ-3 é um dos filtros UV mais comumente usados, é relativamente barata e capaz de absorver a radiação UVA e UVB ^[8]. É uma substância completamente caracterizada e sua concentração máxima permitida em formulações é de 6% ^[9]. No entanto, é sólida à temperatura ambiente, tem coloração amarela, que confere cor indesejável ao produto final. Sua faixa de absorção é dependente de solventes, possui coeficiente de absorção óptica relativamente baixo e é pouco solúvel em preparações cosméticas como loções e cremes ^[6]. Esse produto é conhecido por ser sistematicamente absorvido depois da aplicação tópica, sendo detectado na urina e no leite materno ^{[8][9]}.

Várias estratégias têm sido usadas para reduzir a penetração de filtro solar na pele, incluindo a utilização de diferentes tipos de bases, o aumento na viscosidade da formulação e a incorporação do princípio ativo em nanopartículas, como é o caso da complexação com ciclodextrinas ^[10].

A formação de complexos de inclusão entre a molécula absorvedora de radiação UV (princípio ativo) com ciclodextrina (CD) vem se tornando uma alternativa

promissora tanto para evitar a penetração do filtro solar através da pele, mas também para melhorar a fotoestabilidade desses produtos ^[5].

As CDs, também conhecidas como dextrinas de Schardinger, são oligossacárideos cíclicos, contendo um número variável de unidades de glicose, sendo as mais comuns constituídas de 6, 7 ou 8 unidades, denominadas respectivamente de α -CD (ciclohexaamilose), β -CD (cicloheptaamilose) ou γ -CD (ciclooctaamilose). Elas são substâncias cristalinas, homogêneas e não-tóxicas, que são formadas durante a decomposição de um componente de amido, amilose, o que é feito com o uso de enzimas ^[14].

Em moléculas de CD, unidades de glicose situadas nas cadeias de conformação clássica C_1 estão ligadas através de ligações α -1,4. Essa geometria dá a CD a forma de um cone truncado com um lado mais largo formado pelos grupos de hidroxilas secundárias e um mais estreito formado por um grupo de hidroxilas primárias, como mostra a Figura 4.7 ^{[13][14]}.

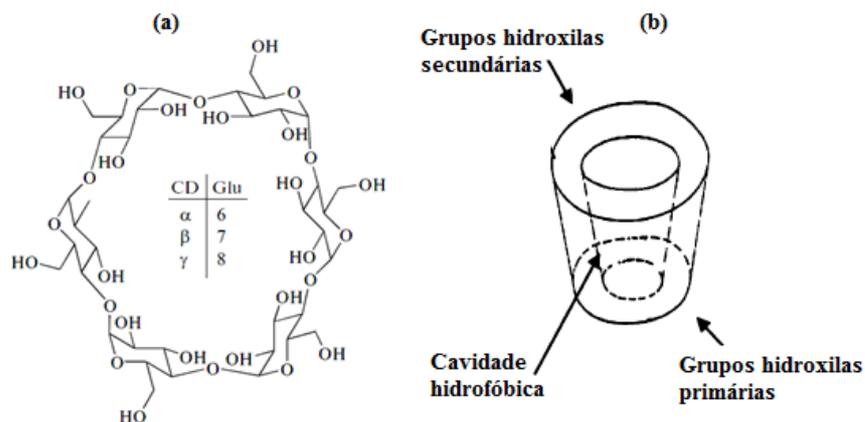


Figura 4.7 – A estrutura das ciclodextrinas: (a) vista do topo (b) na forma de cone truncado ^{[13][14]}.

A cavidade interior é hidrofóbica, revestida por grupos C-H e oxigênios glicosídicos, proporcionando um ambiente menos polar do que o da água. Esta cavidade confere às CDs a capacidade de formar complexos de inclusão, atuando como encapsuladoras ao nível molecular, causando alterações nas propriedades físicas e químicas das moléculas hóspedes ^{[12][13][57][58]}. Nas CDs tem-se um anel de ligações intramoleculares entre os grupos de hidroxilas e unidades de glicose adjacentes, o que resulta em uma estrutura rígida ^[14]. Devido a essas características, as CDs

podem formar complexos de inclusão com uma ampla variedade de compostos sólidos, líquidos e gasosos ^{[57][59]}. Nestes complexos, a molécula hóspede se ajusta dentro da cavidade da molécula de CD hospedeira, desde que seu tamanho seja compatível com a cavidade ^[14].

O diâmetro da cavidade da CD aumenta proporcionalmente ao número de unidades de glicose: 0,57, 0,78, 0,95 nm para α -CD, β -CD e γ -CD, respectivamente. No entanto, a profundidade continua sendo 7,9Å, como ilustra a Figura 4.8. O volume da cavidade das ciclodextrinas é de 174 Å³ (α -CD), 262 Å³ (β -CD), e 472 Å³ (γ -CD) ^[14].

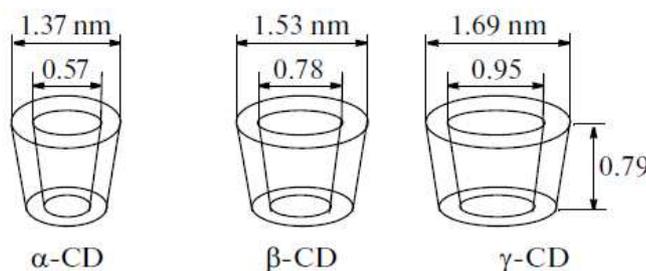


Figura 4.8 – Dimensões da cavidade das ciclodextrinas: α -CD, β -CD e γ -CD ^[14].

As ciclodextrinas são facilmente solúveis em água porque todos os grupos livres de hidroxila estão localizados na superfície exterior do anel ^{[14][58]}. Elas são resistentes à luz e são estáveis em condições normais (pH acima de 3,5 e temperaturas abaixo de 60°C). São facilmente disponíveis, sua produção global é estimada em dezenas de milhares de toneladas ^{[14][59]}.

A propriedade mais importante da CD, tanto em aplicações práticas como em pesquisas científicas, é a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas ^{[12]-[14]}. A cavidade lipofílica das moléculas de ciclodextrina fornece um microambiente em que moléculas apolares de tamanho adequado podem entrar para formar complexos de inclusão ^[59]. A formação do complexo é um ajuste dimensional entre a cavidade hospedeira e a molécula hóspede. A necessidade mínima para a formação desse complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente dentro da cavidade da CD ^{[59][60]}. Ligações covalentes não são quebradas ou formadas durante a formação do complexo ^[59].

A principal força motriz da formação do complexo, em solução, é a liberação de moléculas de água, de alta entalpia, da cavidade. As moléculas de água são deslo-

cadras pela molécula hóspede mais hidrofóbica presente na solução ^{[14][59]}. A Figura 4.9 ilustra o processo de formação do complexo de inclusão.

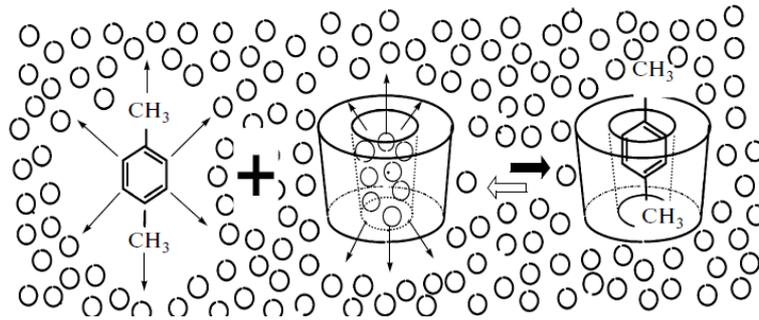


Figura 4.9 – A formação de um IC com uma molécula hóspede hidrofóbica ^[14].

Os complexos podem ser formados seja em solução ou no estado cristalino e a água é o solvente mais usado ^[59]. A montagem geométrica da molécula "hóspede" com a cavidade da CD é ainda mais importante do que fatores químicos. Ambas as partes das cavidades isoladas das moléculas da CD estão abertas, então as moléculas "hóspedes" podem ser inseridas no anel de CD dos dois lados ^[14]. Os complexos de inclusão são formados majoritariamente na relação 1:1 (CD-"hóspede"), mas podem também ser obtidos com estequiometria 1:2, 2:1 e 2:2, que dependerá do tamanho e características estruturais das moléculas "hóspedes" em relação à cavidade hospedeira da CD. A Figura 4.10 mostra um exemplo de complexos de inclusão nas proporções 1:1 e 1:2.

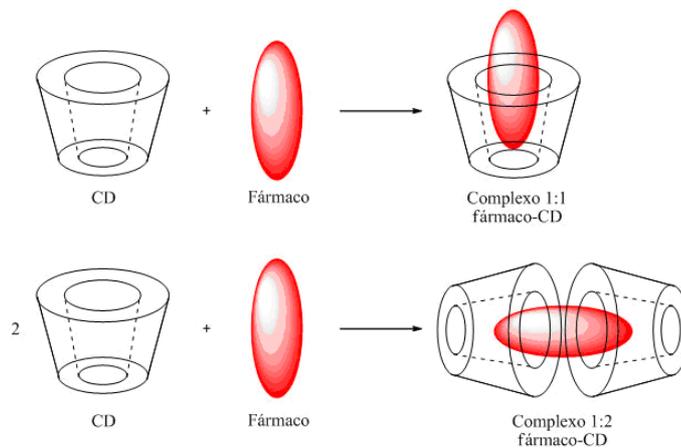


Figura 4.10 – Complexos de inclusão na proporção 1:1 e 1:2 entre um fármaco e a CD ^[61].

Recentemente, várias espécies de derivados das CDs têm sido preparadas com o objetivo de expandir suas propriedades físico-químicas e a capacidade de formação de complexo de inclusão. A β -CD tem 21 grupos de hidroxilas que podem ser modificados, substituindo átomos de hidrogênio ou um grupo de hidroxila por uma variedade de grupos substituintes ^{[58][62]}. Uma ciclodextrina modificada que vem recebendo muita atenção nos últimos anos é a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Ela apresenta algumas vantagens em comparação com a β -CD original, como por exemplo, uma maior solubilidade em água e melhores propriedades de solubilização e complexação ^{[57][58]}. A Figura 4.11 mostra a estrutura molecular da HP- β -CD. Essa CD tem sido utilizada para formar complexos de inclusão com princípios ativos de formulação de filtros solares para dificultar a penetração cutânea e melhorar a estabilidade química desses produtos ^{[10][15][16]}. Os resultados obtidos têm sido promissores.

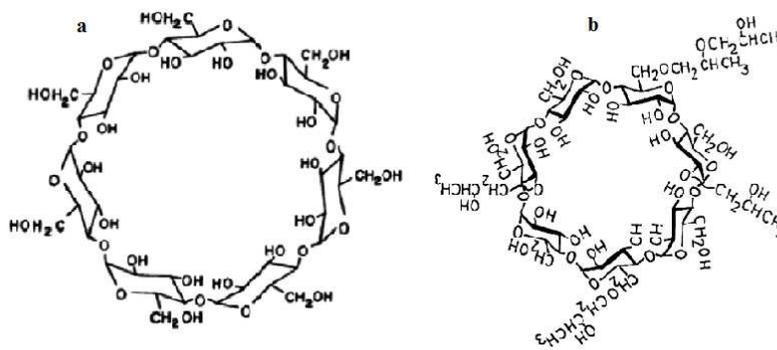


Figura 4.11 – Estruturas: a) β -CD e b) HP- β -CD ^[62].

Ciclodextrinas são utilizadas em diversas áreas, podendo ser incorporadas em gêneros alimentícios, em que há relatos de que 80-90% de colesterol pode ser removido de ovos, queijo e manteiga através da formação do complexo de inclusão entre a CD e o colesterol ^{[14][58]}. Na indústria farmacêutica são amplamente utilizadas, melhorando a liberação de medicamentos através das membranas biológicas. As CDs são passíveis ainda de serem empregadas em cosméticos e na indústria têxtil ^{[14][58]}. Essa vasta aplicabilidade é decorrente das propriedades exibidas por essa molécula, como a disponibilidade em grandes quantidades, sua alta pureza, solubilidade em água, capacidade para formar complexos de inclusão, resistência à luz e ao calor, estabilidade em uma ampla faixa de pH, entre outras ^[14].

4.2 Parte II

4.2.1 Dentes

O dente possui estrutura constituída por uma parte não-calcificada, a polpa, e duas calcificadas, o esmalte e a dentina, ilustradas na Figura 4.12 ^{[38][63]}.



Figura 4.12 – Desenho esquemático da estrutura dentária humana ^[64].

O esmalte é um tecido duro constituído de sais minerais em estruturas cristalinas. Pode atingir espessuras da ordem de 2 a 2,5 mm. Tem como principal função recobrir a região do dente exposta ao meio oral. Sua composição química é formada majoritariamente por material inorgânico, 96% do peso, e uma pequena quantidade de material orgânico e água (4%) ^{[63][65]}. O material orgânico tem aproximadamente 58% de proteínas (amelogeninas, fosfoproteínas, etc.), 40% de lipídios e pequenas quantidades de açúcares, citratos etc ^{[65][66]}.

A dentina é mais dura do que o osso, constitui a massa principal do dente, determinando entre outros fatores a forma da coroa, o número e o tamanho das raízes ^[67]. Cerca de 70% de sua composição é formada por material inorgânico, principalmente cristais de hidroxiapatita, $3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2$ ^[67]. Alguns sais inorgânicos como carbonatos, fosfato de cálcio e sulfato também estão presentes, além de elementos como F, Cu, Zn, e Fe. A parte orgânica corresponde a 18%, e os 12% restantes da dentina são de água. Os colágenos representam 17% do tecido, o que equivale aproximadamente 93% do material orgânico. O ácido cítrico compreende algo menos que 1% e 0,2% são associados aos lipídios, glicosaminoglicanas e proteínas ^{[66][67]}.

Ao contrário do esmalte que é muito duro e quebradiço, a dentina é elástica e passível a deformação. Sua cor é amarela clara em dentes ainda jovens, e se torna mais escura com a idade ^[65].

A matriz orgânica da dentina é sintetizada por células, os odontoblastos, que revestem a parte interna da dentina separando-a da polpa dentária. Cada célula tem um prolongamento citoplasmático que determina a formação de um canalículo na matriz, os túbulos dentinários. Inicialmente seu diâmetro é da ordem de 3 a 4 μm e menor na junção com esmalte, $\sim 1\mu\text{m}$. A proporção do número de túbulos por unidade de área entre a superfície externa e a pulpar é cerca de 4:1. Podendo atingir entre 50.000 e 90.000 por milímetro quadrado na região pulpar. Na coroa esses túbulos têm um trajeto em curva que se assemelha a um S. Na raiz essa curvatura é menos acentuada como mostra a Figura 4.13 ^{[38][65]}. Estes canalículos têm papel importante nos mecanismos de permeação de substâncias através da dentina.

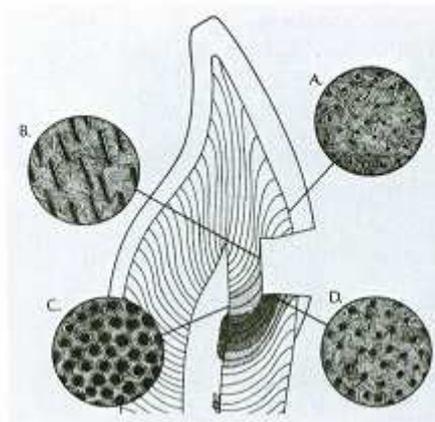


Figura 4.13 – Diagrama ilustrando a curvatura, tamanho e distância entre os túbulos dentinários da dentina humana. 1 mm^2 de cavidade contém ~ 30.000 túbulos ^[65].

A polpa dentária é um tecido ricamente innervado e vascularizado de consistência gelatinosa, localiza-se centralmente e é circundado por dentina, exceto no forame apical, onde se comunica com os tecidos periodontais. Vasos e nervos penetram no ápice da raiz e se ramificam profusamente. A composição da polpa dentária em peso úmido é considerada, como na maioria de tecidos moles, em uma média de 25% de material orgânico e 75% de água ^{[38][67]}.

4.2.2 Cárie dentária e terapia fotodinâmica

A cárie dentária está entre as doenças mais comuns no mundo ocidental ^[68]. É uma doença crônica infecto-contagiosa que envolve desmineralização do esmalte seguido da destruição da fase orgânica da dentina. É dependente de inúmeros fatores como os genéticos, ambientais, dietéticos e bacterianos ^[69]. É fortemente influenciada pelo freqüente consumo de carboidratos e pela ação dos componentes salivares. Ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos promovem a desmineralização do dente deixando a superfície dentária mais susceptível ao aparecimento de lesões de cárie ^{[20][70]}.

A cárie tem início com a formação de um biofilme, a placa dentária, que se forma sobre os dentes, onde estão presentes muitas espécies microbianas. *Streptococcus mutans* é uma das mais importantes bactérias presentes na placa dentária, e seu crescimento é o primeiro passo no desenvolvimento da cárie ^{[17][18]}.

A partir da desmineralização do esmalte, a lesão avança em direção à dentina, onde forma uma área de dentina desmineralizada sob uma zona desmineralizada e infectada com bactérias ^[69]. Clinicamente há grandes dificuldades na diferenciação entre essas zonas e a remoção apenas da dentina contaminada torna-se extremamente crítica, conseqüentemente grande quantidade de tecido sadio é removida durante o preparo cavitário. Assim, seria de extremo interesse o desenvolvimento de um tratamento baseado em propriedades de agentes bactericidas que fossem capazes de ocasionar a morte bacteriana, diminuindo a necessidade de remoção de uma grande quantidade de tecido, aumentando a longevidade do dente restaurado ^[69].

A terapia fotodinâmica (PDT) surge neste cenário como uma alternativa promissora, uma vez que ela pode ser confinada à área da lesão pela aplicação cuidadosa de um agente fotossensibilizador bem como a restrição da irradiação por meio do uso de uma fonte de luz localizada ^[69]. O efeito antimicrobiano da PDT é o resultado de reações fotoquímicas que ocorrem com a associação de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e uma fonte de luz aplicadas ao tecido lesionado. Ao ser irradiada a molécula do fotossensibilizador passará para um estado excitado, e voltando ao estado fundamental, irá transferir esta energia para o sistema, induzindo assim um efeito fotoquímico que normalmente leva a morte bacteriana por dano oxidativo ^[20].

Diversos fotossensibilizadores (FS) com finalidade antimicrobiana são estudados e testados. No entanto, a capacidade de uma substância em absorver luz incidente não significa necessariamente que ela possa atuar como um FS. Para produzir efeito antimicrobiano, o agente fotossensibilizador deve apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não deve apresentar danos tóxicos ao hospedeiro ^{[17][70]}.

Os danos causados pelos fotossensibilizadores em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais, que estão resumidos na Figura 4.14 pelo diagrama de Jablonski ^[71]. No primeiro (mecanismo TIPO I), a molécula do FS passa do estado fundamental S_0 para o estado excitado singlete (S_1). A partir do estado S_1 a molécula pode retornar ao estado fundamental por meio de processos radioativos (fluorescência), emitindo um fóton de energia, ou então por meio de processos não-radioativos (relaxações vibracionais). Pode passar do estado S_1 para o estado excitado tripleto T_1 ^[20]. A energia das moléculas excitadas em estado tripleto é transferida para o oxigênio ou outras biomoléculas por meio da transferência de elétron que culmina em danos diretos às biomoléculas via formação de espécies ativas de oxigênio, por exemplo, o radical superóxido ^{[20][71]}.

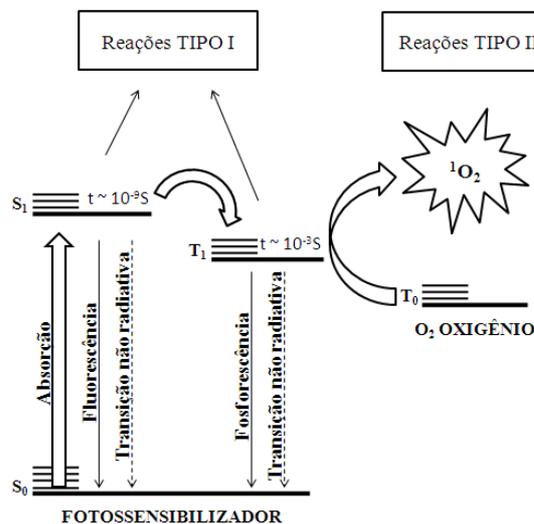


Figura 4.14 – Diagrama de Jablonski ^[71].

No mecanismo TIPO II, o tempo de vida do estado tripleto (T_1) é grande o suficiente para permitir que a energia de excitação seja transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto, que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar danos em membranas, proteínas e DNA, tanto por ação

direta quanto por formação de radicais a partir do oxigênio singlete ^{[20][71]}. Ele pode ser detectado por emissão luminosa no infravermelho próximo ou pelo calor liberado. Seu tempo de vida em água é de aproximadamente 2 μ s podendo ser reduzido em aproximadamente 100 vezes em sistemas biológicos. Pode efetuar várias reações com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, levando ao dano em biomoléculas e induzindo morte celular ^{[20][71]}.

Para a terapia fotodinâmica (PDT) ambos os processos são de grande interesse, uma vez que propiciam à formação de moléculas muito reativas. Entretanto estudos mostram que o efeito fotodinâmico geralmente ocorre pelo mecanismo TIPO II ^[20].

Entre as vantagens da PDT em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, temos primeiramente que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microorganismos improvável ^{[20][70]}. Também, o uso do fotossensibilizador ou da radiação em separados, não apresentam efeito significativo sobre as bactérias, de modo que a ação antimicrobiana da terapia fica restrita à região contendo corante e irradiada simultaneamente. Finalmente, o caráter atraumático da PDT mostra-se bastante aplicável a pacientes especiais e pediátricos ^{[20][70]}.

4.2.3 Fotossensibilizadores

Para a evolução da terapia fotodinâmica é necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre os fotossensibilizadores, buscando novos compostos que possam contribuir para uma maior atividade e menor custo. Os estudos *in vitro* e *in vivo* destes compostos tem apresentado grandes contribuições, não só na busca de fotossensibilizadores mais eficazes, mas também no entendimento dos mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade, contribuindo para o avanço e popularização da terapia fotodinâmica ^[20].

Para que um composto venha a atuar como um bom fotossensibilizador é importante que este apresente algumas características gerais ^{[20][70]}:

- banda de absorção e eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio;
- mínimo efeito tóxico às células normais;
- fotossensibilidade não prolongada;
- simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado;
- farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
- alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade).

Diversos fotossensibilizadores com finalidade antimicrobiana são estudados sendo os mais comuns para utilização tópica os corantes da família das fenotiazinas, como o azul de metileno e o azul de toluidina. Corantes xantenos também apresentam resultados satisfatórios em que se destacam o rosa de bengala, a eosina, a eritrosina e a fluoresceína ^{[70][72]}.

O azul de metileno (MB) é um composto fenotiazínico aromático heterocíclico de cor azul, solúvel em água, com absorção máxima na região do vermelho ($\lambda=660\text{nm}$) ^{[20][73]}. É um fotossensibilizador hidrofílico de baixo peso molecular e carga positiva ^[74]. A massa molar do MB é 319,85 g/mol, e sua fórmula molecular, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$, está representada na Figura 4.15. Apresenta baixa toxicidade, uma vez que este composto é utilizado na área médica para uma série de finalidades terapêuticas, como tratamento de metahemoglobinemia, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto, descontaminação de plasma do sangue, psoríase e como marcador cirúrgico de ressecção de tumores, neste caso em concentrações muito superiores às utilizadas na terapia fotodinâmica ^{[20][72]}.

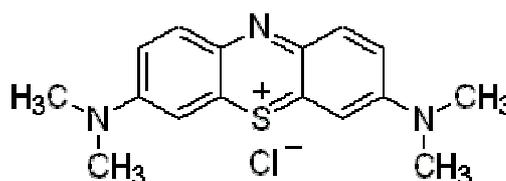


Figura 4.15 – Estrutura molecular do azul de metileno ^[75].

Assim como o MB o azul de orto-toluidina (TBO) é um composto fenotiazínico, eles possuem estruturas químicas similares e exibem propriedades físico-químicas parecidas ^[19]. Apresenta absorção máxima na região do vermelho, em torno de 630 nm. É um fotossensibilizador eficiente na inativação de organismos patogênicos, incluindo vírus, bactérias e fungos, sendo utilizado com sucesso no tratamento de lesões ocasionadas por esses patógenos na cavidade oral ^[72]. A derivação orto refere-se à posição em que o grupo metilo (-CH₃) está ligado ao grupo funcional amino (-NH₂). Sua massa molar é 107,17 g/mol, e sua fórmula molecular, C₁₆H₁₆N₃S, está representada na Figura 4.16 ^[76].

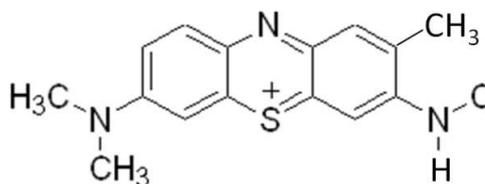


Figura 4.16 – Estrutura molecular do azul de *o*-toluidina ^[76].

Outra substância que pode ser utilizada como fotossensibilizador é o verde de malaquita (MG), um corante catiônico da família dos trifenilmetano com três anéis benzênicos, e sua fórmula molecular é C₂₃H₂₅N₂ representada na Figura 4.17. Apresenta forte absorção na região vermelha do espectro ^{[77][78]}. O verde malaquita tem sido usado como corante em uma variedade de materiais, a partir de pigmentos em tecidos e cerâmicas até como corantes biológicos. É um composto básico e tem afinidade para polieletrólitos aniônicos em solução, albumina de soro bovino e lipídios, incluindo algumas substâncias como ácidos graxos, colesterol e glicolipídios e fosfolipídios ^[78]. Possui aplicação rotineira na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme dentário ^[22].

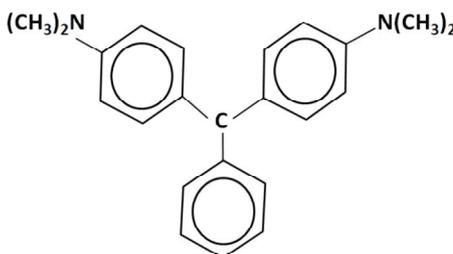


Figura 4.17 – Estrutura molecular do verde de malaquita ^[76].

Uma das principais fontes de luz, empregada na terapia fotodinâmica, para excitar as moléculas dos fotossensibilizadores é o laser, devido a sua concentração elevada de energia, baixa divergência, coerência e monocromaticidade ^[20] ^[69]. Esta última de grande interesse, pois ao se estudar um determinado meio composto por diversos materiais, é possível, ao iluminá-lo, interagir apenas com uma das moléculas constituintes desse meio, apenas selecionando um determinado comprimento de onda da luz do laser que irá interagir com essa molécula específica ^[20].

Outra fonte luminosa de grande interesse na terapia fotodinâmica é o LED (Light Emitting Diode) ^[20]. Comparado ao laser de baixa potência também produz irradiação num comprimento de onda específico, porém em uma faixa mais ampla no espectro eletromagnético, favorecendo a obtenção de complementaridade com os FS utilizados. Além disso, apresenta custo menor, o que permitiria uma maior popularização desta técnica ^[20]^[70].

Em ambos os casos, o desafio é selecionar o comprimento de onda de acordo com a absorção óptica do fotossensibilizador, e mais importante, conhecer a taxa de distribuição do mesmo ao longo da dentina. Este é o foco desse estudo com a fotoacústica para se obter o perfil de penetração do fotossensibilizador ao longo da dentina.

Procedimentos e montagens experimentais

5.1 Parte I

5.1.1 Preparação dos complexos de inclusão e do protetor solar

A preparação dos complexos nanoencapsulados foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Enzimática da Universidade Estadual de Maringá pela Mestra em Ciências Farmacêuticas Fernanda Berbicz^[79], sob orientação da Prof^a. Dr^a. Graciette Matioli.

Primeiramente foram obtidos os complexos de inclusão entre BZ-3 e a ciclodextrina (HP- β -CD) pelo método de co-precipitação, em que a molécula hóspede ou sua solução é adicionada lentamente com agitação à solução aquosa de CD. Para obter o complexo de inclusão, a BZ-3 foi dissolvida em 20 mL de álcool etílico e adicionada à solução de HP- β -CD em 30 mL de água em uma quantidade molar correspondente à razão estequiométrica de 1:1 e 1:2. A mistura foi mantida em 150 rpm por 120 h, a 37°C e protegida da luz ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada em membrana Millipore 0,45 μ m e submetida a um evaporador rotativo a 40°C, sob vácuo.

O protetor solar foi elaborado a partir de uma formulação padrão (base), constituída por Eumulgin® HRE-40, 8%, (Saint Fargeau Ponthierry, França), Acculyn® -33, 10%, (La Mirada, EUA), trietanolamina, 2%, (San Francisco, EUA) e água em quantidade suficiente para se obter 10 g de produto contendo 4% de BZ-3.

5.1.2 Modelo de estudo em animais

Para os estudos em animais, foram utilizados coelhos albinos machos na fase adulta da raça New Zealand, pesando cerca de 2,9 kg. Eles foram mantidos a 20 °C, ciclo de claro/escuro de 12 h em gaiolas individuais por 15 dias, na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, com água e ração (Nuvital®, Colombo, Brasil) *ad libitum*. Os animais utilizados foram divididos em quatro grupos. As aplicações foram realizadas no lado côncavo da orelha esquerda, sendo que os controles foram tratados com água destilada. As aplicações foram realizadas uma vez por dia, pela manhã, ao mesmo tempo cada dia. O Grupo A foi tratado com água destilada, em ambas as orelhas, o grupo B recebeu a formulação base, o grupo C recebeu a formulação contendo BZ-3 e o grupo D recebeu a formulação contendo o complexo de inclusão BZ-3- HP- β -CD.

No 15º dia, 30 minutos após a aplicação das formulações, os animais foram sacrificados por overdose de tiopental (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA). As orelhas foram removidas e as medidas de penetração percutânea foram tomadas após a remoção da pele, resultando em amostras com espessuras (l_s) variando de 350-450 μm . A amostra final foi composta pelo estrato córneo, epiderme e derme. Com este procedimento, os experimentos com a fotoacústica foram realizados cerca de 20 minutos após o abate dos animais.

As medidas foram feitas a partir da iluminação na face externa da pele, ou seja, do lado em que as formulações foram aplicadas, e também na face interna (dermal), oposta àquela da aplicação, conforme ilustrado na Figura 5.1.

A frequência de modulação da luz foi ajustada em 22 Hz para a medida na face externa e em 22 e 38 Hz quando a iluminação foi na face interna da pele. A potência total da lâmpada foi de 700 W. Foram obtidas as absorções da pele controle que recebeu apenas aplicação de água, bem como a pele com as respectivas formulações. Para estas frequências de modulação utilizadas e sendo a difusividade térmica da pele da ordem de $4,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ obtêm-se que os valores dos comprimentos de difusão térmica, que é a profundidade em que o calor gerado contribui para o sinal fotoacústico, foram de 24 μm e 18 μm , respectivamente. Lembrando que a espessura das amostras variou de 350 μm a 450 μm .

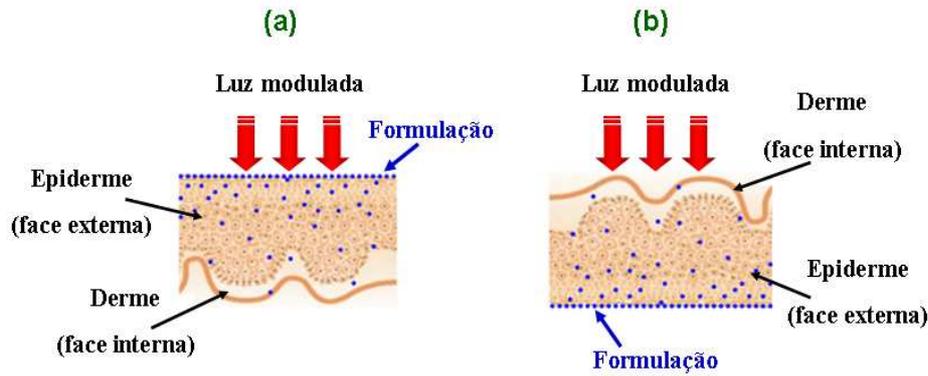


Figura 5.1 – Esquema da realização dos espectros de absorção: (a) iluminando a face externa da pele (b) iluminando a face interna da pele.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob o protocolo n CEAE. 050/2008.

5.2 Parte II

5.2.1 Amostras de dentina

Para a realização da pesquisa foram utilizados trinta e seis dentes, molares ou pré-molares permanentes, humanos, hígidos e com indicação para extração, obtidos na Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Maringá. Logo após a extração, os dentes foram limpos com gaze e água destilada ou solução fisiológica 0,9%, e então estocados em recipientes individuais contendo 5 mL de água destilada onde permaneceram até o momento em que foram realizados os cortes para confecção das amostras.

Os dentes foram cortados em forma de bloco por um disco de diamante (South Bay Technology; Diamond Wheel, San Clement, Califórnia, USA), acoplado a uma máquina de corte (Isomet Low Speed Saw; Bluehler, Lake Bluff, IL, USA). Cada dente originou um único bloco de amostra, sendo que os cortes foram realizados na seguinte ordem:

1ª etapa: corte realizado a uma distância de 3 mm da junção coroa-raiz, com remoção da porção oclusal do dente, como mostra a Figura 5.2(a);

2ª etapa: corte realizado a uma distância de 2 mm da junção coroa-raiz, com obtenção de uma fatia de 0,4 mm, como ilustra a Figura 5.2(b);

3ª etapa: remoção da camada de esmalte das paredes do dente com lixa de granulação 600 (NORTON® Ind. Brasileira) acoplada a uma politriz DPU-10 (Panambra, São Paulo, Brasil), tomando-se o cuidado para se remover toda essa camada. Em seguida foi ajustada as dimensões da amostra, também na politriz, para obtenção de blocos com medidas de 4 mm (comprimento) x 4 mm (largura) x Y (espessura), em que Y representa a espessura das amostras, que variaram de acordo com o corante utilizado e o tempo de exposição do mesmo sobre a amostra. O controle da espessura foi possível com o auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo® Digimatic Micro-meter; Kanagawa, Japan). Esta etapa está esquematizada na Figura 5.2(c).

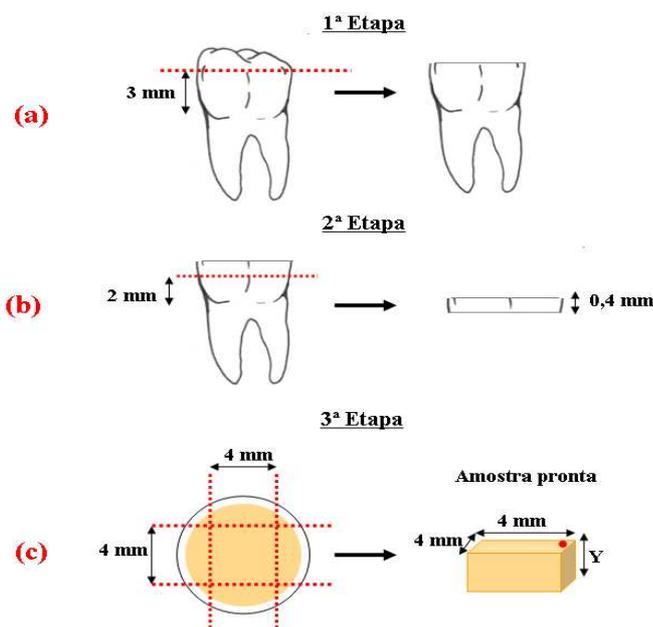


Figura 5.2 – Desenho esquemático do processo de preparação das amostras: (a) 1ª etapa, (b) 2ª etapa e (c) 3ª etapa.

A Figura 5.3 mostra fotografias dos dentes ao serem cortados durante o processo de preparação das amostras.

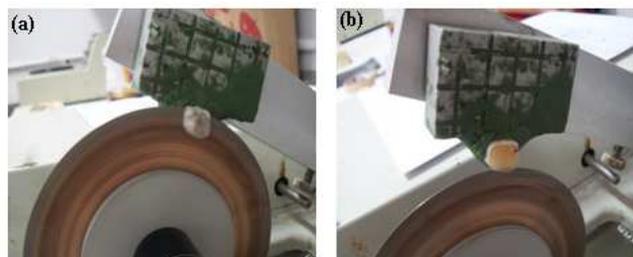


Figura 5.3 – Cortes: (a) remoção da parte oclusal (b) remoção da raiz com obtenção de uma fatia do dente de 0,4 mm, notar a marca vermelha feita na superfície do dente.

Após o primeiro corte, a superfície oclusal da futura amostra foi marcada com um esmalte vermelho para distinguir as duas superfícies que seriam similares após a realização do segundo corte. A padronização das superfícies foi adotada seguindo o seguinte critério: a superfície oclusal (região mais externa do dente) marcada com esmalte corresponde à superfície em que o fotossensibilizador seria aplicado posteriormente e a superfície oposta (pulpar), sem marcação de esmalte e que seria submetida a desgastes progressivos.

As amostras obtidas, cujo aspecto final está representado na Figura 5.4(a), foram armazenadas em recipientes identificados contendo 5 mL de água destilada, como ilustrado na Figura 5.4(b), e os remanescentes dentários também foram estocados em água destilada para utilização em outros experimentos.

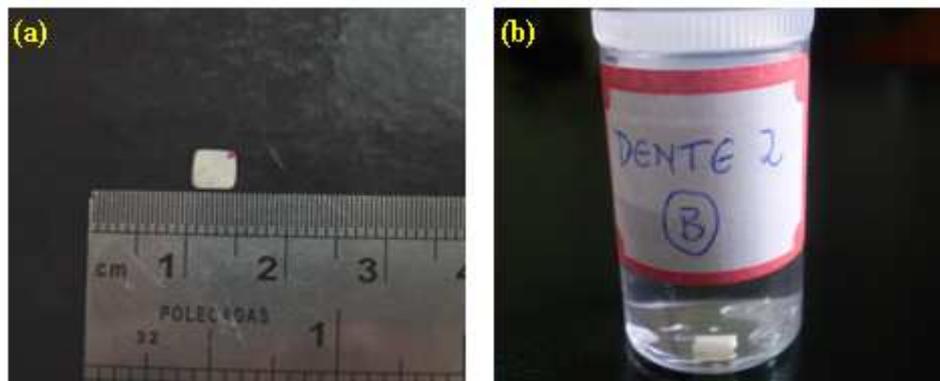


Figura 5.4 – (a) Aspecto final da amostra, (b) recipiente onde ficou armazenada a amostra.

5.2.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) azul de metileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), azul de orto-toluidina (Nuclear Produtos Para Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) e verde de malaquita (Synth Produtos Para Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) foram diluídos em água destilada e preparados nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL. Esses FS permaneceram estocados em recipientes isolados da luz e mantidos à temperatura ambiente.

A aplicação do fotossensibilizador sobre a superfície oclusal da amostra de dentina foi possível com o auxílio de uma pipeta volumétrica (FINNPIPETTE® F1 Thermo Scientific), em que se utilizou uma alíquota de 10 μ L. O fotossensibilizador permaneceu agindo sobre a amostra durante intervalos de tempo de 1, 5 e 30 minu-

tos, como mostra a Figura 5.5. Após esse período de exposição, o seu excedente foi removido com auxílio de um cotonete. Em seguida a amostra foi posicionada na célula fotoacústica para realização da medida.

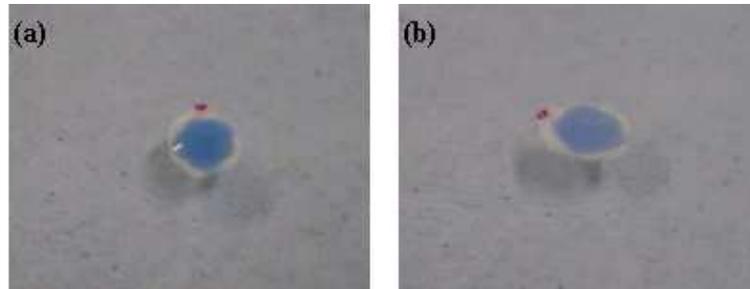


Figura 5.5 – (a) Azul de metileno (MB) imediatamente após aplicação sobre a mostra (b) amostra com MB 30 minutos após aplicação.

As amostras foram distribuídas aleatoriamente em grupos que variavam a concentração e o tempo de exposição aos fotossensibilizadores (FS) empregados, como mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Distribuição das amostras conforme a concentração e intervalo de tempo de exposição aos FS usados.

	Concentração 0,1mg/ml			Concentração 0,01mg/ml
	30 min	5 min	1 min	5 min
Azul de metileno (MB)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra
Azul de <i>o</i>-toluidina (TBO)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra
Verde de malaquita (MG)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra

Os espectros de absorção das amostras de cada grupo foram obtidos de forma consecutiva, assim as leituras do próximo grupo se iniciaram apenas com a conclusão das leituras do grupo anterior.

As medidas foram realizadas a partir da iluminação da superfície oclusal e posteriormente da superfície pulpar da amostra controle, ou seja, a amostra antes da aplicação do fotossensibilizador, como ilustra a Figura 5.6 (a) e (b). Em seguida o procedimento foi repetido para a amostra após a aplicação do fotossensibilizador, como mostra os passos (c) e (d) da Figura 5.6.

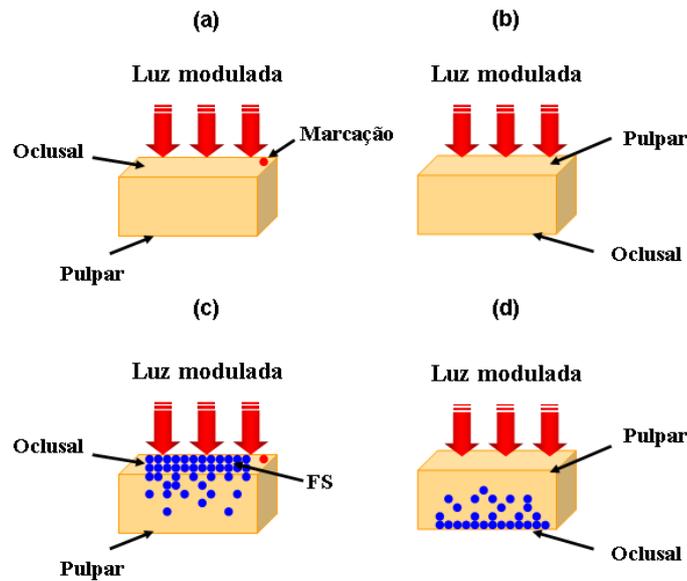


Figura 5.6 – Esquema da realização dos espectros de absorção: antes da aplicação do FS, iluminando (a) o lado oclusal (b) o lado pulpar; após a aplicação do FS, iluminando (c) o lado oclusal (d) o lado pulpar.

Para avaliar a permeação do fotossensibilizador através da dentina, foram obtidos espectros de absorção em função da espessura da amostra. As medidas foram realizadas logo após a leitura do lado pulpar com aplicação do fotossensibilizador, como descrito anteriormente. A metodologia adotada consistia em lixar o lado pulpar da amostra com lixa de granulação 1500 (NORTON® Ind. Brasileira) a seco, com movimentos leves e manuais. Em seguida era obtido o espectro de absorção iluminando sempre o lado pulpar da amostra. Com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo® Digimatic Micrometer; Kanagawa, Japan) a espessura foi gradativamente reduzida e monitorada, e a cada redução, novas leituras foram realizadas. No início do processo as amostras tinham em torno de 300 μm de espessura e ao término das medidas cerca de 100 μm . Todos os grupos de amostras foram sujeitos a esse procedimento. É importante mencionar que o corante é aplicado uma única vez. Cada vez que a amostra era lixada a superfície era limpa com cotonete, a seco.

Para a realização dos experimentos a frequência de modulação da luz foi ajustada em 16 Hz e a potência da lâmpada em 700 W. Sendo a difusividade térmica da dentina humana da ordem de $0,2 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ obtêm-se que o valor do comprimento de difusão térmica, para esta frequência de modulação, foi de aproximadamente 60

μm . A Figura 5.7 mostra a região monitorada na amostra durante a realização dos espectros de absorção.

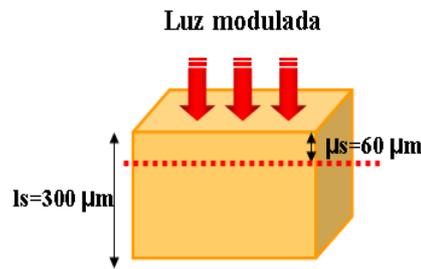


Figura 5.7 – Comprimento de difusão térmica na amostra de dentina.

O desenvolvimento desta pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá e a Declaração do Banco de Dentes com a concessão dos dentes que foram utilizados na pesquisa encontram-se nos ANEXOS do trabalho.

5.3 Montagem experimental da espectroscopia fotoacústica

O arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a realização dos experimentos está esquematizado na Figura 5.8

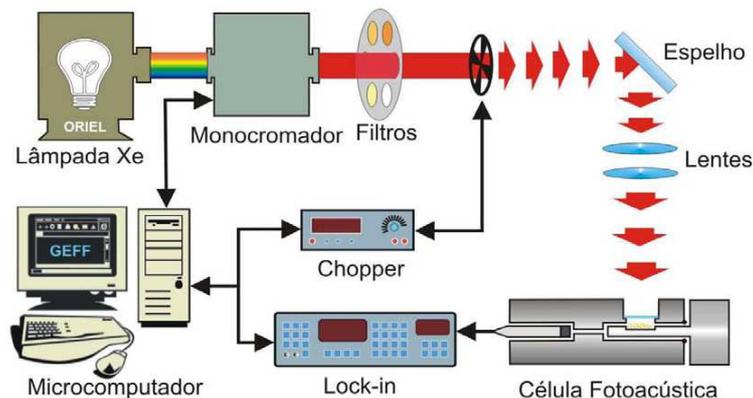


Figura 5.8 – Representação esquemática do arranjo experimental da PAS.

Nesta montagem a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio da marca Oriel, modelo 68820, com potência de até 1000 Watts [W], e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. O monocromador, modelo 77250 (1/8 m) da Oriel, foi utilizado com fendas de entrada e saída, ajustadas em 3,16 mm. A grade de difração é da marca Oriel em que foi utilizado o modelo 77296. Para eliminar ordens superiores de

difração filtros foram usados. A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico, modelo SR 540 da Stanford Research Systems que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador Lock-in. As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de emissão da lâmpada.

A célula fotoacústica utilizada tem formato cilíndrico e está representada na Figura 5.9. O microfone acoplado à célula fotoacústica é da marca Brüel & Kjaer, modelo BK 2669, e está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sincronizado) modelo 5110 da marca EG & G Instruments. O Lock-in fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB.

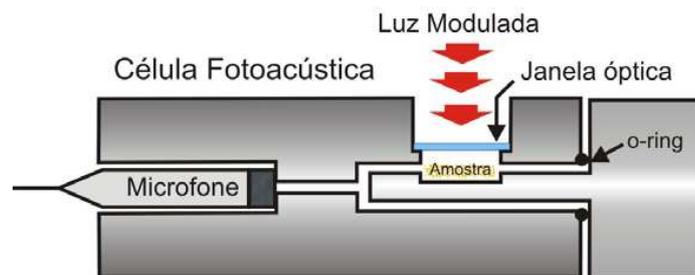


Figura 5.9 –Célula fotoacústica fechada vista lateralmente.

Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal é então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

Resultados e discussão

6.1 Parte I – Complexos nanoencapsulados para proteção solar

6.1.1 Determinação da resposta espectral das formulações.

A Figura 6.1(a) mostra os espectros de absorção óptica do fármaco, BZ-3, do agente complexante, HP- β -CD, dos complexos de inclusão (BZ-3 - HP- β -CD), nas estequiometrias 1:1 e 1:2, e da base. Nota-se que a BZ-3 e os complexos exibem altas taxas de absorção nas regiões espectrais, do UVC até o UVA. A diminuição da intensidade da absorção do complexo 1:2 em relação a do 1:1 ocorre em razão da menor concentração de BZ-3 na amostra. Na estequiometria 1:2 é possível observar uma estrutura de bandas, que por comparação, permite associar aquela em torno de 280 nm com o agente complexante HP- β -CD e a de 380 nm com a BZ-3.

Uma vez observado que o complexo 1:2 apresentou absorção óptica intensa nas regiões do UVB e do UVA, esta concentração foi adotada para a preparação da formulação do filtro solar. Relembrando que isto foi feito adicionado-se o complexo à base, de forma a obter 4% de BZ-3 na formulação final do produto. A Figura 6.1(b) mostra os espectros da base pura (repetido para efeito de comparação), da base com BZ-3 e da base com complexo. Nota-se que ocorre absorção óptica na região do UV, até aproximadamente 350 nm. Esta resposta espectral é semelhante ao que se obtém nos filtros comerciais contendo BZ-3. Este resultado também mostra que para se ob-

ter proteção solar em toda a região do UVA os protetores comerciais à base de BZ-3 precisam adicionar protetores físicos na formulação.

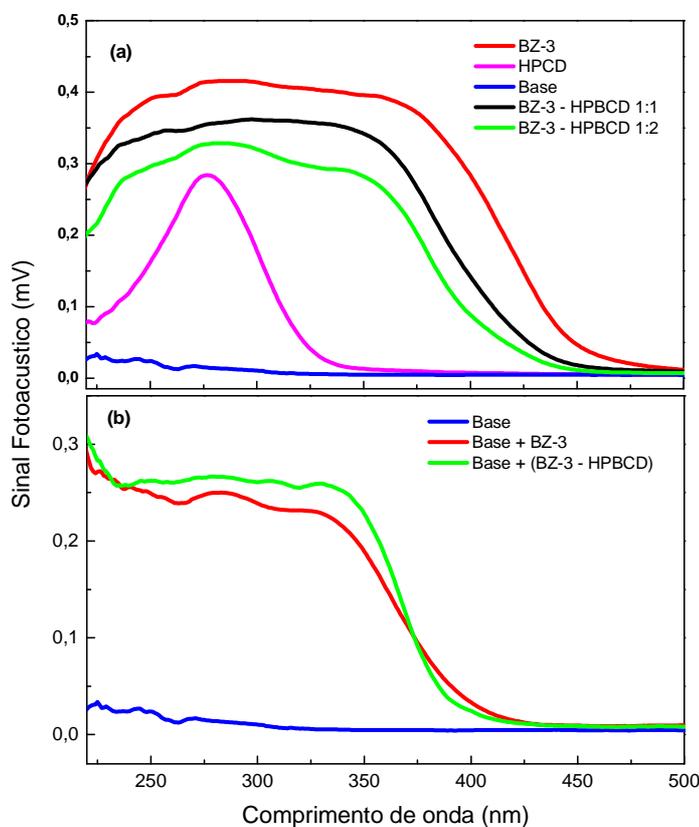


Figura 6.1 – Espectros de absorção óptica: (a) base; BZ-3, HP- β -CD e complexos 1:2 e 1:1; (b) base e formulações (base+BZ-3 e base+ BZ-3 - HP- β -CD).

É importante mencionar que as formulações com BZ-3 apresentam cor amarela, o que é indesejável para cosméticos ^{[6][8]}. Essa coloração não ocorreu no complexo de (BZ-3 - HP- β -CD), não influenciando então na aparência do produto final.

Experimentos rotineiros utilizados na comprovação de complexo de inclusão com CDs foram descritos na dissertação de mestrado da Farmacêutica Fernanda Berbicz ^[79]. Os resultados e discussão apresentados na presente dissertação concentraram-se no emprego inovador da espectroscopia fotoacústica na avaliação da proteção e estabilização de complexo de inclusão com CDs. Utilizando a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e a Termogravimetria (TG) Berbicz ^[79] demonstrou que a melhor formação do complexo ocorreu para a estequiométrica 1:2.

6.1.2 Medidas *ex vivo* da difusão das formulações através pele

Primeiramente foram obtidos os espectros de absorção óptica da pele controle. Em seguida as medidas foram realizadas nas amostras de pele que receberam as formulações tópicas. Isto foi feito iluminando-se o lado da epiderme (onde as formulações foram aplicadas), com modulação da luz incidente em 22 Hz. Nas medidas no lado da derme utilizou-se a modulação em 22 e em 38 Hz, como descrito na seção 5.1.2. Os resultados estão mostrados na Figura 6.2.

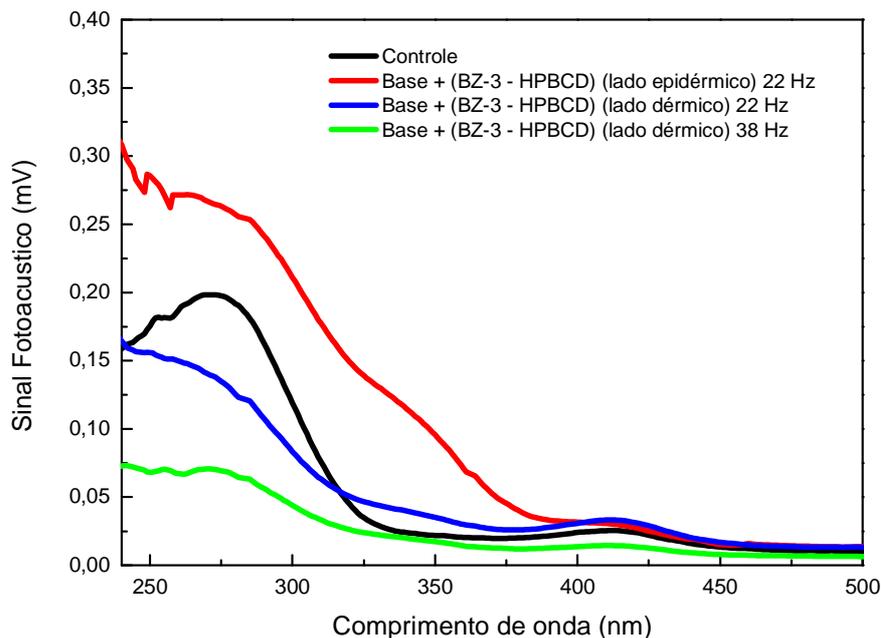


Figura 6.2 – Espectros de absorção das amostras de pele com aplicação de água (controle) e da formulação contendo o complexo (BZ-3 - HP- β -CD), medidos nos dois lados da amostra, da epiderme em 22 Hz e da derme em 22 e 38 Hz.

Os espectros dos componentes que formam o complexo, Figura 6.1, foram utilizados para identificar essas substâncias na pele, o que foi feito a partir da análise da Figura 6.2. Nota-se que a banda de absorção da HP- β -CD, centrada em torno de 276 nm, pode ser observada em todos os espectros. No entanto, não é possível atribuir esta absorção como proveniente somente da formulação, uma vez que a pele controle também absorve a radiação nesse comprimento de onda. Além disso, as condições de hidratação da amostra também podem influir na intensidade da absorção. Porém, no intervalo entre 325 e 380 nm não foram observadas bandas de absorção na amostra controle, indicando que a BZ-3 foi a responsável pela absorção

óptica nesta faixa espectral. A presença da formulação pode ser observada inclusive nos espectros obtidos no lado da derme, em ambas as frequências de modulação utilizada. Isto demonstra que houve permeação do complexo através da pele. É importante mencionar que a banda em torno de 410 nm é atribuída aos resíduos de sangue presentes na amostra [80].

A Figura 6.3 mostra todos os espectros de absorção óptica das amostras de pele que foram tratadas com as formulações. Os resultados para a iluminação do lado da epiderme, obtidos com uma frequência de 22 Hz, estão representados pelas curvas na Figura 6.3(a). Como mencionado anteriormente, o comprimento de difusão térmica (μ_s) na pele que contribue para a geração do sinal fotoacústico é da ordem de 24 μm . Assim, como esperado, para iluminação no lado de epiderme (região onde as formulações foram aplicadas), a absorção em torno de 380 nm das curvas em verde e em vermelho mostram a presença da absorção da BZ-3.

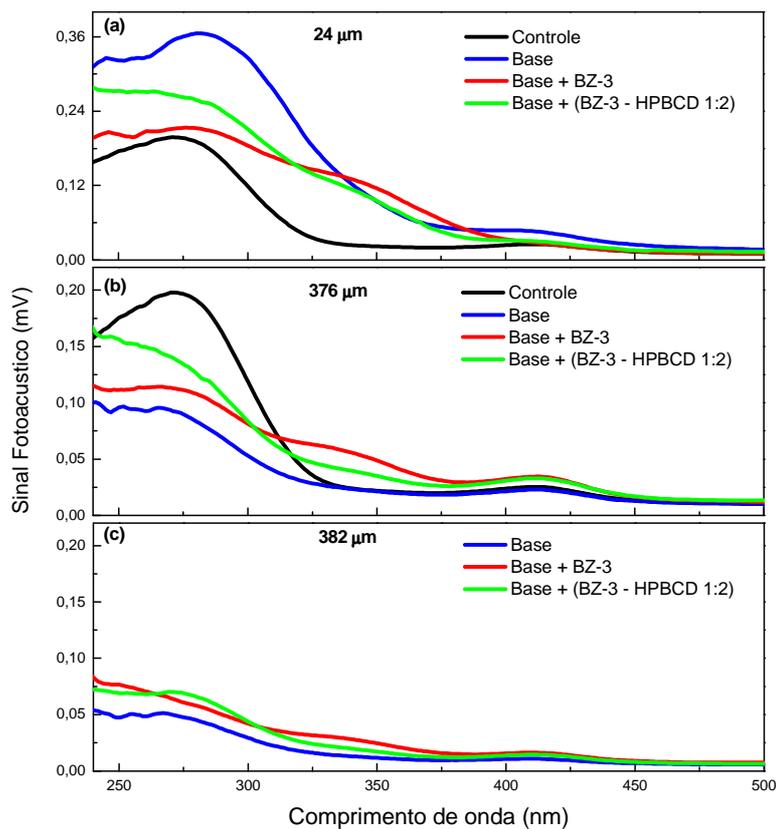


Figura 6.3 – Espectros de absorção das amostras de pele com aplicação tópica das formulações: (a) iluminação no lado da epiderme, com frequência de modulação de 22 Hz; (b) do lado da derme com frequência de modulação de 22 Hz; (c) do lado da derme com frequência de modulação de 38 Hz.

As curvas em b e c mostram os espectros avaliados no lado da derme. Nota-se a presença da banda de absorção das formulações, em torno de 350 nm. Como as amostras tinham em torno de 400 μm de espessura e as frequências usadas para obter os espectros foram de 22 e de 38 Hz, a detecção desta banda significa que as profundidades de penetração abaixo da superfície da pele foram em torno de 376 e 382 μm , respectivamente para cada frequência de modulação utilizada. A Figura 6.4 ilustra uma das regiões monitoradas, usando-se $f=22\text{Hz}$, durante a realização dos espectros de absorção com iluminação do lado da derme.

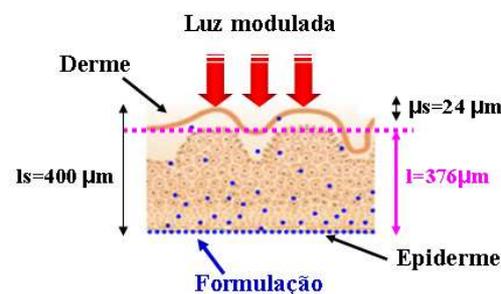


Figura 6.4 – Análise do perfil de profundidade para as amostras de pele. No desenho estão indicadas as espessuras de penetração, a partir do lado da epiderme, para a medida realizada em 22 Hz.

Na Figura 6.3(b) e (c) observou-se que na região espectral de interesse para proteção solar (300-400 nm), a formulação do complexo de (BZ-3-HP- β -CD) apresentou uma menor permeação em comparação com a formulação contendo apenas a BZ-3. Verificou-se ainda que o espectro da pele com aplicação da base pura reproduz o comportamento observado naquele da pele controle. Uma possível explicação para a menor permeação do complexo pode ser o caráter lipofílico da pele, o que dificulta a propagação de compostos hidrofílicos em sua estrutura. Hadgraft^[81] explicou que a rota de penetração predominante é através dos espaços intercelulares que contêm lipídios estruturados e que uma molécula de difusão tem de atravessar uma variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos antes que ela chegue a junção entre o estrato córneo e a epiderme.

Estudos anteriores também mostraram que a complexação com CD, inclusive HP- β -CD, reduziu significativamente a liberação e penetração de BZ-3 através da pele. Usando pele de rato, Felton e colaboradores^[15] demonstraram que a HP- β -CD

aumentou significativamente a retenção cutânea da benzofenona, embora naquele trabalho a distribuição do protetor solar na pele não tenha sido avaliada.

Simeoni e colaboradores ^[10] mostram em seu trabalho que a complexação de benzofenona com um tipo de β -CD (SBE- β -CD) reduz acentuadamente a sua penetração percutânea. Estes autores observaram uma retenção de até 82% do filtro solar na camada córnea para a formulação complexada. Observaram ainda que a inclusão na cavidade da SBE- β -CD permitiu uma distribuição mais localizada de benzofenona na superfície da pele, o que contribui para reforçar o poder de fotoproteção do filtro solar.

Comedogenicidade é uma consideração importante no desenvolvimento de medicamentos tópicos, cosméticos e produtos de cuidados da pele. O conceito de "acne cosmética" foi desenvolvido para associar a utilização de certas substâncias para a formação de comedos e modelos animais têm sido utilizados para se determinar o potencial comedogênico ^[82]. Assim, paralelamente à análise da PAS, foram realizadas por F. Berbic ^[82], análises macroscópicas e histológicas da pele para se determinar o potencial comedogênico das formulações do fotoprotetor após a aplicação tópica. As amostras de 3 cm² foram removidas de cada orelha do animal, e o número e o comprimento de comedos foram avaliados em 6 cortes histológicos por animal. Os comedos foram mensurados em microscópio Olympus BX40, em objetiva de 10X e com auxílio de régua com escala de 0-100 acoplada à ocular de 10X. Os valores foram convertidos a μ m. Foram quantificados todos os comedos observados ao longo dos cortes histológicos avaliados. Os comedos foram divididos em 3 grupos: pequeno (<400 μ m), médio (400-850 μ m) e grande (>850 μ m). Os comedos de cada grupo foram contados e multiplicados pelos fatores 0,5, 2 e 5 para os grupos pequenos, médios e grandes, respectivamente. Após o somatório dos resultados dos três grupos, o potencial comedogênico de cada orelha foi classificado como ausente (valores <10), suave (10 < valores < 30), moderado (30 < valores < 90) e severo (valores > 90) segundo o protocolo da EVIC-CEBA Laboratoire de Recherche et d'Experimentation.

As observações macroscópicas realizadas diariamente nas orelhas dos coelhos sugeriram que não houve a presença de comedos, nem sinais irritativos como eritema, descamação epitelial e reações inflamatórias, tanto no grupo tratado com a base, com a base e BZ-3 e com a base e o complexo BZ-3 - HP- β -CD (na relação estequi-

ométrica de 1:2). A análise estatística dos resultados histológicos mostrou que apenas o grupo tratado com a formulação contendo BZ-3 apresentou diferença significativa no potencial comedogênico, com comedos médios e potencial comedogênico com valores variando de 10 a 30. Nos outros grupos de tratamento observou-se apenas pequenos comedos e potencial comedogênico com valores inferiores a 10. Assim, foi possível concluir que a formulação com complexo BZ-3- HP- β -CD não mostrou potencial comedogênico.

6.1.3 Método de separação de espectros na fase ($MS\phi$)

O método de separação dos espectros na fase foi aplicado para se avaliar a diferença de fase do sinal fotoacústico em função dos comprimentos de onda da excitação e para comparação entre os compostos e a pele. Trata-se de um método alternativo que permite realizar deconvolução dos espectros de absorção e pode permitir investigar a presença e/ou a penetração das formulações ao longo da espessura da amostra.

A separação de fase foi realizada monitorando-se dois comprimentos de onda, em 276 nm (Pico 1) e em 340 nm (Pico 2), para as amostras de pele com aplicação da base, base + BZ-3 e da base + complexo (BZ-3 e HP- β -CD). Escolhemos as medidas realizadas com frequência de modulação de 22 Hz e com a excitação no lado da derme. Os resultados para a amostra de pele com aplicação de (base + BZ-3) estão apresentados na Figura 6.5.

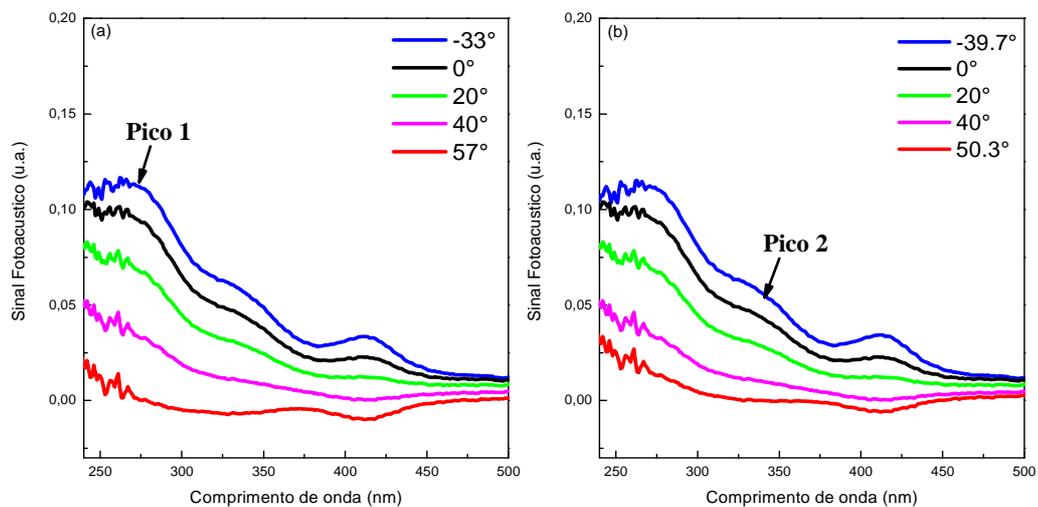


Figura 6.5 – Projeções dos espectros fotoacústicos para as amostras de pele com aplicação de (base + BZ-3). Cada curva representa a projeção total do espectro para o ângulo de fase indicado.

Para o pico 1 (276 nm) a banda de absorção é minimizada em um ângulo de fase de 57° . Conseqüentemente sua maximização é obtida somando $\pm 90^\circ$, escolhendo-se a opção que fornece o espectro no lado positivo do eixo. Neste caso obteve-se o ângulo de -33° . Para o pico 2, a banda de absorção centrada em 340 nm é minimizada em $50,3^\circ$ e maximizada em $-39,7^\circ$. Assim a diferença de fase entre esses picos foi de $6,7^\circ$. Podemos associar cada pico analisado a um centro absorvedor diferente, responsável pela absorção observada, ou a mecanismos diferentes de relaxação não radiativa de um dado centro absorvedor. Na Figura 6.3 vimos que a absorção em 276 nm era referente à absorção da pele e a em 340 nm à BZ-3. A diferença de fase entre estes dois centros absorvedores foi de $6,7^\circ$.

A Figura 6.6 é uma ampliação da Figura 6.5, na qual pode-se observar com maior evidência que ao escolhermos um ângulo de fase que minimiza a contribuição da pele para o sinal fotoacústico, no pico 1, tem-se que a banda da BZ-3 (pico 2) fica isolada. Isto possibilita avaliar separadamente a sua contribuição para o espectro de absorção total da amostra. A partir dessa figura confirma-se a presença dos dois centros absorvedores.

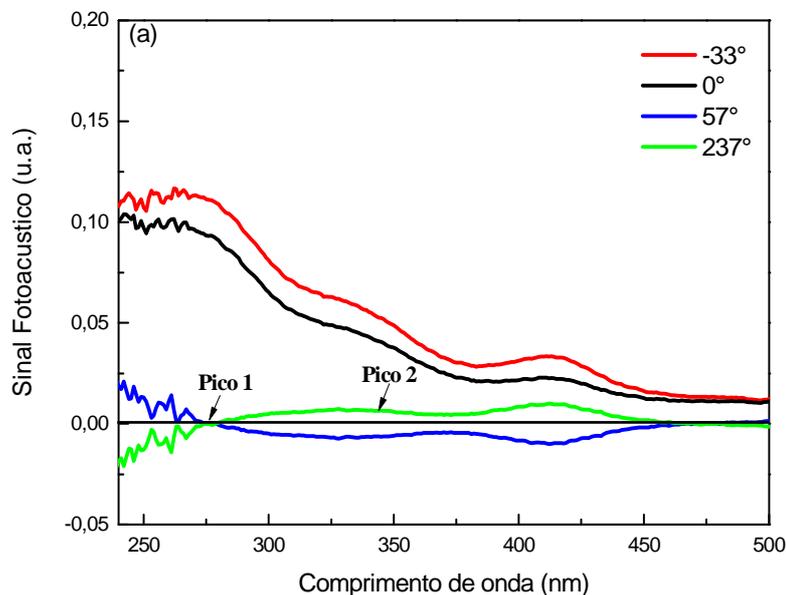


Figura 6.6 – Projeções dos espectros fotoacústico para as amostras de pele com aplicação da base + BZ-3. A curva em verde, para o ângulo de 237° , é obtida somando-se 180° ao ângulo em que o pico 1 foi minimizado, 57° , funcionando como uma curva “espelho” da azul.

A separação de espectro na fase para a amostra de pele com aplicação da formulação contendo a base + o complexo (BZ-3+HP- β -CD) está representada na Figura 6.7.

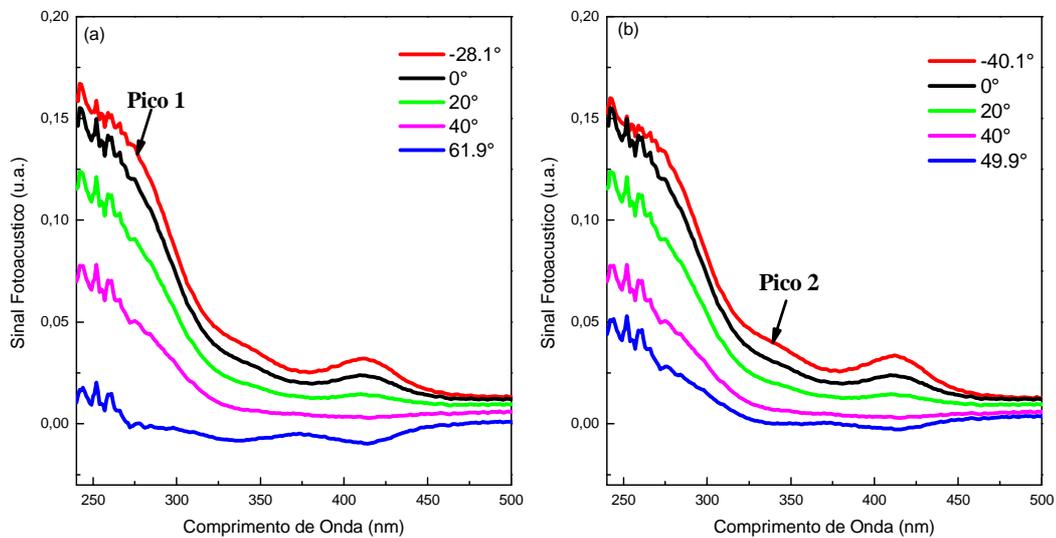


Figura 6.7 – Projeções dos espectros fotoacústicos em diferentes ângulos de fase para a amostra de pele com aplicação da formulação contendo a base + o complexo (BZ-3 + HP- β -CD).

O pico 1 é minimizado em um ângulo de fase de $61,9^\circ$ e maximizado no ângulo de $-28,1^\circ$. Já o pico 2 é minimizado em $49,9^\circ$ e maximizado em $-40,1^\circ$. Resultando portanto em uma diferença de fase de 12° . O aumento na diferença de fase entre a pele e a BZ-3 observado neste caso sugere que a HP- β -CD possa estar contribuindo para o sinal fotoacústico em 276 nm, como propusemos ao analisar os espectros de absorção apresentados na Figura 6.3. O ângulo no qual o pico 1 foi zerado foi diferente daquele para a amostra que continha apenas BZ-3. A diferença entre essas amostras é a molécula de CD, cuja absorção máxima é em 276 nm. Uma vez que a HP- β -CD contribui para o espectro nesse comprimento de onda em adição a absorção da pele, é possível que a diferença de fase desses centros absorvedores superpostos em relação à BZ-3 seja diferente da observada para a amostra base + BZ-3, o que justificaria o resultado encontrado.

A Figura 6.8 mostra mais detalhadamente a separação de fase para a amostra de pele com aplicação da base + complexo. Com a banda em 276 nm sendo minimizada podemos observar a banda da BZ-3 isolada, confirmando assim a presença de pelo menos dois centros absorvedores.

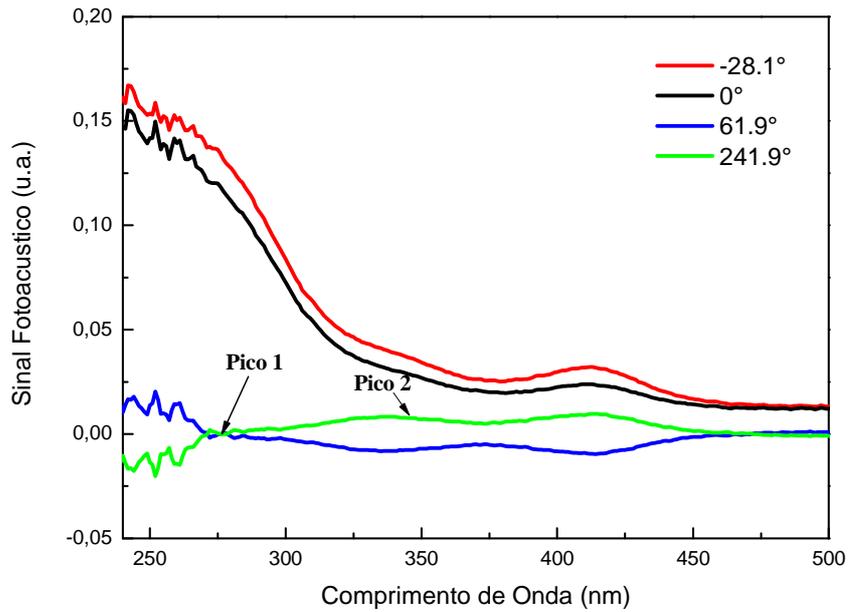


Figura 6.8 – Projeções dos espectros fotoacústicos para as amostras de pele com aplicação da formulação contendo a base + o complexo. A curva em verde, para o ângulo de 241,9°, é obtida somando-se 180° ao ângulo de 61,9°.

Utilizamos o método também para a amostra de pele com aplicação apenas da base. A Figura 6.9 mostra as curvas projetadas para diferentes ângulos de fase. Não houve separação dos picos analisados, uma vez que a base não continha BZ-3 e sua absorção é mínima na região do pico 1. Assim concluímos que neste caso o único centro absorvedor presente na amostra era o da pele.

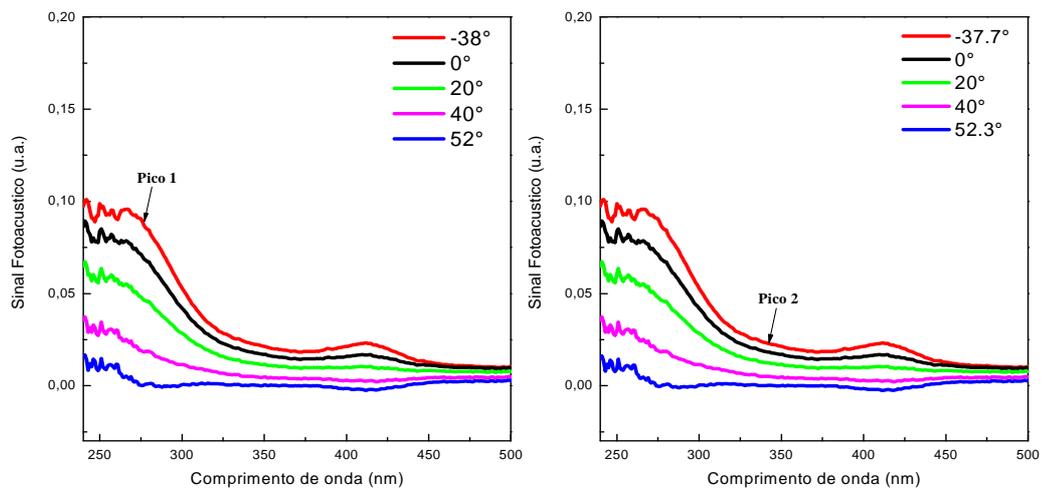


Figura 6.9 – Projeções dos espectros fotoacústicos representadas para diferentes ângulos de fase para as amostras de pele com aplicação de base.

A Tabela 6.1 mostra um resumo dos ângulos para os quais os espectros foram representados, além das diferenças entre as fases dos sinais dos centros absorvedores (ψ). Lembrando que, $\phi_i = \phi'_i \pm 90^\circ$ é o ângulo em que a banda de absorção i é maximizada; ϕ'_i é o ângulo para o qual a banda de absorção é nula e ψ_{ij} é a diferença de fase $\psi_{ij} = \phi_i - \phi_j$. Sendo $i=1,2$ os picos 1 e 2 correspondentes as bandas de absorção onde foi realizada a separação de fase para cada amostra analisada.

Tabela 6.1 – Valores dos ângulos de fase e das respectivas diferenças obtidos para os centros absorvedores das amostras analisadas.

Amostra	Pico 1		Pico 2		ψ_{12}
	ϕ'_1	ϕ_1	ϕ'_2	ϕ_2	
Pele + (Base +BZ3)	57°	-33°	50,3°	-39,7°	6,7°
Pele + (Base+Complexo (BZ-3+HP- β -CD))	61,9°	-28,1°	49,9°	-40,1°	12°
Pele + Base	52°	-38°	52,3°	-37,7°	0,3°

Com o auxílio do método de separação dos espectros na fase foi possível identificar dois centros absorvedores presentes nas amostras de pele com aplicação de BZ-3 e do complexo. Para este último os resultados ainda sugerem a possível existência de um terceiro centro absorvedor superposto ao da pele. Como esperado para a amostra com aplicação da base, identificamos apenas a pele como centro absorvedor. Assim, os resultados confirmam a penetração da formulação através da pele permitindo realizar uma deconvolução espectral que evidenciou as bandas de absorção óptica atribuídas a cada centro absorvedor.

Finalmente, propusemos um diagrama, mostrado na Figura 6.10, que ilustra o procedimento experimental adotado e a conclusão de que o nanoencapsulamento realizado contribuiu para diminuir a taxa de permeação da formulação através da pele.

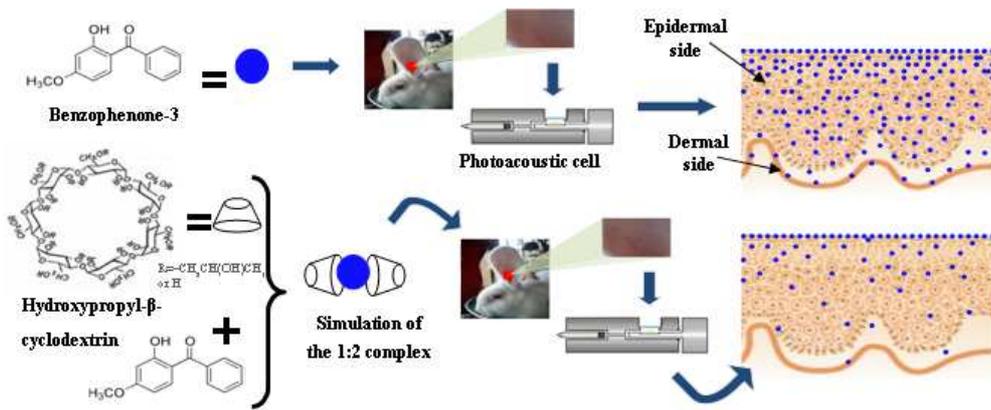


Figura 6.10 – Representação esquemática do procedimento experimental e dos resultados obtidos [82].

6.2 Parte II - Corantes e a permeabilidade dentinária

6.2.1 Espectros de absorção nas regiões espectrais do UV-VIS.

O objetivo geral desta segunda parte do trabalho foi avaliar a permeabilidade dentinária de alguns fotossensibilizadores (FS) usados na terapia fotodinâmica (PDT). O primeiro passo na realização dos experimentos foi obter os espectros de absorção das amostras de dentina humana sem aplicação do FS. Essa leitura foi realizada em todas as amostras uma vez que serviu de controle para comparação dos espectros que foram obtidos posteriormente. A Figura 6.11 mostra a absorção óptica da dentina medida a partir das superfícies oclusal e pulpar.

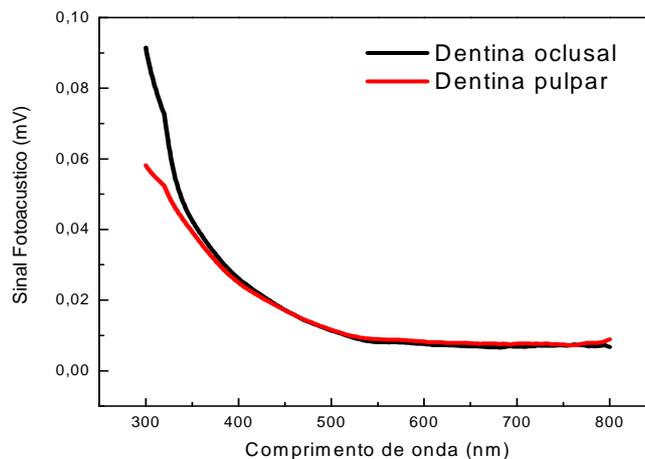


Figura 6.11 – Espectros de absorção óptica das duas superfícies da amostra de dentina antes da aplicação do FS.

Nota-se que a dentina só é altamente transparente para comprimentos de onda acima de 500 nm. Isto indica que a escolha da fonte de luz é decisiva em termos do alvo que se pretende atingir no interior dente. Voltaremos a este ponto mais adiante.

Os espectros dos fotossensibilizadores foram obtidos a partir da espectrofotometria. Para as medidas, o azul de metileno, o azul de *o*-toluidina e o verde de malaquita tiveram suas concentrações diluídas em água destilada a 0,001 mg/mL. A Figura 6.12 mostra os espectros de absorção óptica dos fotossensibilizadores nas regiões do UV-VIS. Nota-se que as bandas de absorção na região acima de 600 nm ocorrem onde a dentina é altamente transparente, conforme mostra a Figura 6.11. Ou seja, estes compostos podem ser excitados no interior da dentina se estes comprimentos de onda no vermelho forem escolhidos para a iluminação.

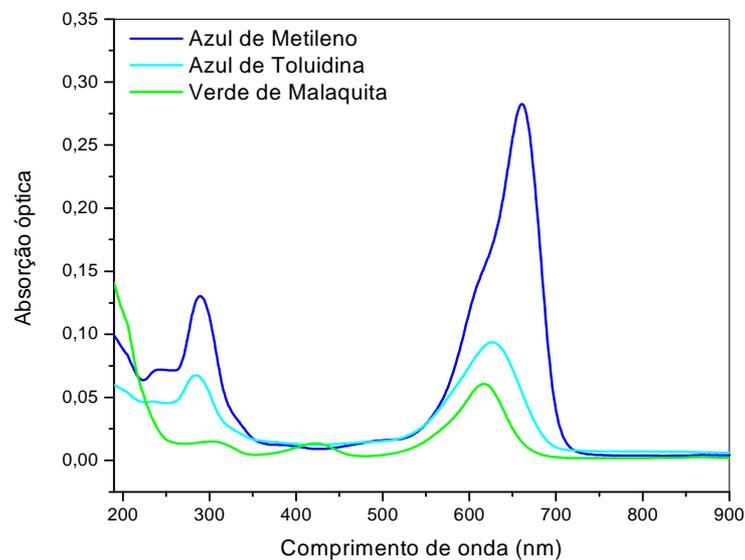


Figura 6.12 – Espectros de absorção óptica dos fotossensibilizadores, azul de metileno, azul de *o*-toluidina e verde de malaquita, na concentração de 0,001 mg/mL.

Em seguida foram obtidos os espectros de absorção óptica das amostras de dentina após aplicação dos fotossensibilizadores, o que foi feito seguindo-se o procedimento descrito na seção 5.2.2. Como mostrado na tabela 5.1, dividimos as amostras em grupos de acordo com a concentração e os intervalos de tempo de exposição aos fotossensibilizadores.

A Figura 6.13 mostra os espectros obtidos medindo-se a amostra 1, utilizada para se avaliar a permeação do azul de metileno (MB) a 0,1 mg/mL. As medidas foram iniciadas 30 minutos após a aplicação do MB. As espessuras iniciais das três

amostras deste grupo foram de aproximadamente 0,35 mm e o pico de absorção máxima do MB ocorreu em aproximadamente 593 nm.

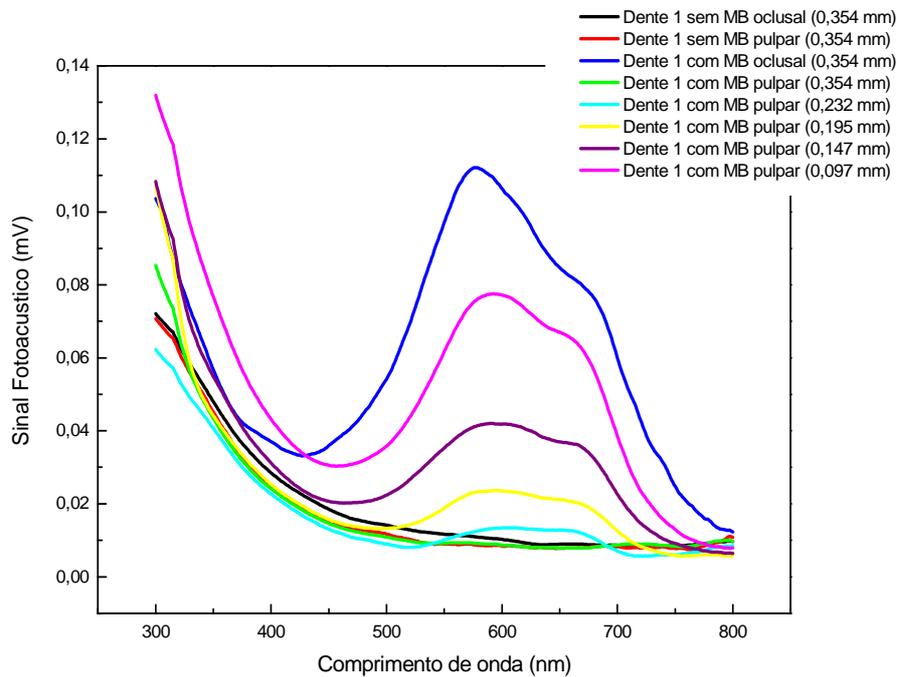


Figura 6.13 – Espectros de absorção fotoacústico da amostra de dentina com aplicação do MB a 0,1 mg/mL. Medidas iniciadas 30 minutos após a aplicação do fotossensibilizador.

As curvas em preto e em vermelho foram obtidas nas superfícies oclusal e pulpar da amostra controle, respectivamente. As demais foram obtidas após a aplicação do fotossensibilizador. As intensidades das bandas de absorção óptica foram avaliadas em função das espessuras da amostra. Observa-se que à medida que a espessura da amostra diminui o sinal fotoacústico aumenta. Esse comportamento é esperado, uma vez que, conforme o lado pulpar era lixado as leituras eram realizadas em regiões cada vez mais próximas daquela onde o fotossensibilizador foi aplicado. Consequentemente, uma maior quantidade do agente fotossensibilizador era detectada na espessura de prova, μ_s , que contribuía para a geração do sinal fotoacústico. A Figura 6.14 ilustra as regiões da amostra monitoradas durante a realização dos espectros de absorção com iluminação do lado pulpar, antes e após o processo de diminuição da espessura da amostra.

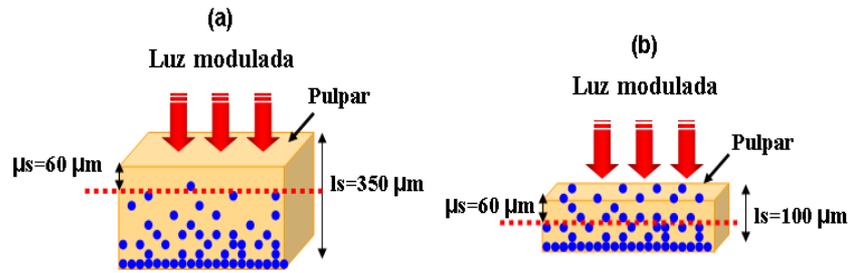


Figura 6.14 – Representação do comprimento de difusão térmica, μs , a partir do lado pulpar: (a) na amostra antes de ser lixada (b) na amostra menos espessa, ao final do processo de diminuição da espessura.

Na amostra 1, a primeira espessura de detecção do MB foi de aproximadamente 0,23 mm, e o valor médio de detecção encontrado para as três amostras avaliadas foi de 0,24 mm. Considerando o comprimento de difusão térmica de 60 μm e a espessura média de detecção de 240 μm , tem-se que a profundidade de penetração do MB foi da ordem de 180 μm .

O comportamento da permeação dos fotossensibilizadores através da dentina foi analisado pela integração das áreas referentes às bandas de absorção óptica dos FS, para as diferentes espessuras da amostra. A Figura 6.15 mostra a dependência das áreas referentes às bandas de absorção do fotossensibilizador em função da espessura de dentina. Observa-se que as áreas calculadas fornecem uma curva exponencial decrescente em função do aumento da espessura da amostra. Estes valores foram ajustados a uma equação exponencial decrescente, Eq.(6.1), para avaliarmos a distribuição do fotossensibilizador (FS) ao longo da estrutura dentinária.

$$S(x) = S_0 + A \cdot \exp^{-x/\tau} \quad (6.1)$$

em que S representa a área da banda do FS na dentina, x corresponde a espessura da amostra, S_0 e A são constantes de estágio de saturação e amplitude, respectivamente, e τ um parâmetro de ajuste que estima a porcentagem de FS em uma determinada espessura da dentina. A curva em vermelho representa o ajuste calculado por meio da equação (6.1). O parâmetro de ajuste, τ , encontrado foi de aproximadamente $(70 \pm 6) \mu m$.

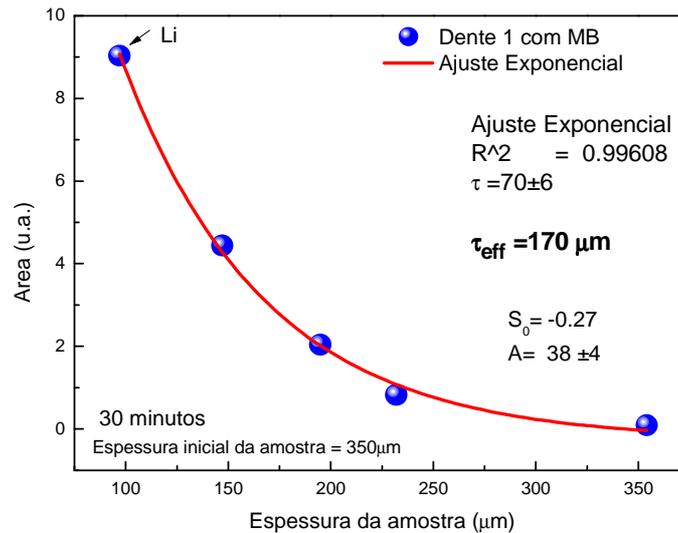


Figura 6.15 – Comportamento das áreas do espectro fotoacústico do FS (MB) em função da espessura da amostra. Ajuste obtido a partir de $x \sim 100 \mu\text{m}$.

Como o ajuste é calculado com a referência no ponto inicial do gráfico (ponto máximo), temos que o τ obtido para o MB foi de aproximadamente $70 \mu\text{m}$ a partir da menor espessura da amostra, que neste caso foi (Li $\sim 100 \mu\text{m}$). Então o τ efetivo (τ_{eff}) para o MB com aplicação de 30 minutos foi de $170 \mu\text{m}$. Este procedimento foi repetido para todas as amostras que receberam a aplicação do azul de metileno. A partir do cálculo das médias obteve-se o valor de aproximadamente $64 \mu\text{m}$. Se considerarmos as áreas das bandas de absorção do fotossensibilizador como um índice de concentração do mesmo na dentina, podemos estabelecer, por meio da equação de ajuste, uma estimativa da porcentagem do fotossensibilizador em uma determinada espessura da amostra.

Por exemplo, se considerarmos o valor de 1τ , temos que a concentração de MB cai a $1/e$ do seu valor inicial. Assim, em $164 \mu\text{m}$ de espessura a concentração de MB é de aproximadamente 37% em relação à quantidade inicial do FS medida na menor espessura, (Li). Em uma espessura de 3τ tem-se que a redução de MB será de 95%, resultando que em $292 \mu\text{m}$ apenas aproximadamente 5% da concentração medida em Li está presente. Este resultado indica que o procedimento adotado permite a obtenção do perfil de distribuição do fotossensibilizador ao longo da espessura da amostra.

O ajuste realizado anteriormente foi obtido a partir do primeiro ponto experimental correspondente a menor espessura da amostra (Li $\sim 100 \mu\text{m}$), mas podemos

por meio da equação exponencial realizar o ajuste partindo de qualquer outro ponto da curva referente a outras espessuras da amostra, inclusive para espessuras inferiores ao primeiro ponto experimental. A Figura 6.16 mostra o ajuste para a amostra de dentina com a aplicação do azul de metileno realizado a partir de $x=0$ e passando pelos pontos experimentais o que corresponde obter o ajuste a partir da superfície da amostra onde o fotossensibilizador foi aplicado. Portanto, mesmo não possuindo valores experimentais entre $0 < x < 100$ podemos com esta análise matemática obter uma estimativa de como seria a distribuição do fotossensibilizador ao longo da espessura da amostra monitorando desde a superfície.

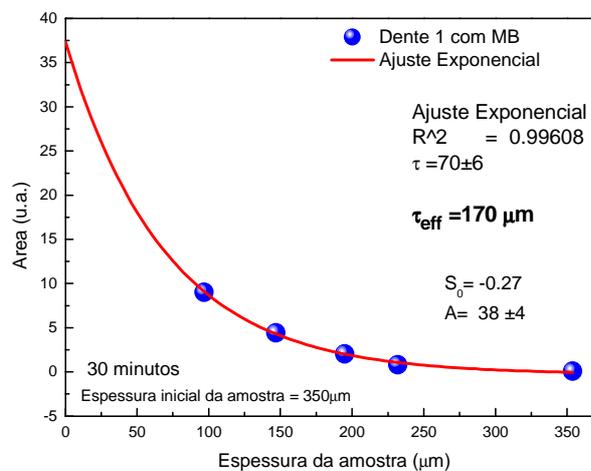


Figura 6.16 – Comportamento das áreas do espectro fotoacústico do FS (MB) em função da espessura da amostra. Ajuste obtido a partir de $x=0$.

O ajuste realizado na Figura 6.16 mostra que os valores das constantes S_0 e A e o parâmetro τ , que determina a inclinação da curva, não variaram com relação ao ajuste obtido na Figura 6.15. Este resultado é de grande interesse, pois possibilita obter em que espessura da amostra a concentração do fotossensibilizador tem sua concentração reduzida a $1/e$ do valor presente no ponto escolhido como referência (Li), inclusive ao ponto $x=0$ (superfície da amostra). Portanto, considerando o ajuste a partir de $x=0$ e o valor de τ obtido de $(70 \pm 6) \mu\text{m}$ temos que a concentração do azul de metileno é reduzida a $1/e$ do valor presente na superfície da amostra, em aproximadamente $70 \mu\text{m}$ de espessura. Mais adiante voltaremos a explorar este resultado. O parâmetro de ajuste τ seria o mesmo encontrado para os ajustes realizados com a Eq.(6.1) se os dados experimentais fossem ajustados com a equação $S(x) = S_0 + \exp^{-(x-x_0)/\tau}$, em que a contribuição da amplitude da exponencial foi

compensada por uma translação em x de um valor de x_0 . A Figura 6.17 mostra o ajuste para o dente 1 com aplicação de MB obtido com esta equação mostrando que o valor de τ não diferiu do encontrado com a Eq. (6.1).

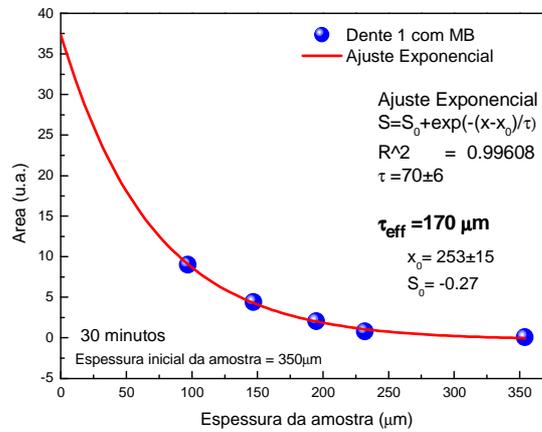


Figura 6.17 – Comportamento das áreas do espectro fotoacústico do FS (MB) em função da espessura da amostra. Ajuste obtido trocando a amplitude A da exponencial por um deslocamento de x_0 .

Como 30 minutos de aplicação do fotossensibilizador (FS) é considerado um intervalo de tempo clinicamente inviável, fizemos novas medidas com os experimentos realizados após aplicação do FS na dentina por 1 e 5 min, respectivamente. A Figura 6.18 mostra a permeação do azul de metileno a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 min. Estes dados foram obtidos medindo-se a amostra 3. A espessura inicial das três amostras avaliadas nesse grupo foi de aproximadamente 0,3 mm.

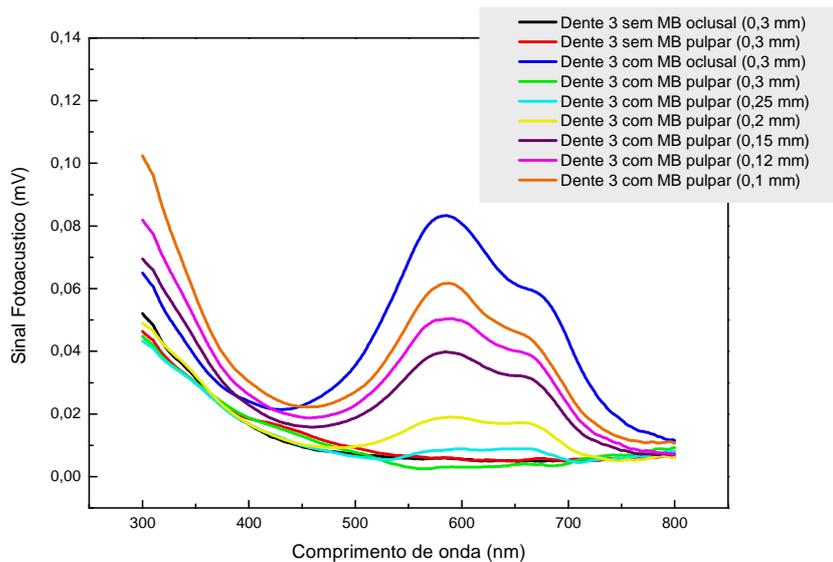


Figura 6.18 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de MB a 0,1mg/mL. As medidas foram iniciadas 5 min após a aplicação do FS.

Nota-se que na medida com a amostra com 0,25 mm já se detectou a presença do MB. As espessuras médias de detecção para as três amostras avaliadas nesse grupo foram em torno de 0,24 mm. Considerando o comprimento de difusão térmica de 60 μm temos também que a profundidade de penetração do MB foi de aproximadamente 180 μm , equivalente ao encontrado quando a medida foi realizada 30 min após a aplicação do fotossensibilizador.

Foi realizado ainda, em apenas uma amostra, a medida após 1 min de aplicação do azul de metileno a 0,1 mg/mL. A espessura inicial da amostra foi de 0,29 mm e o MB foi detectado em torno de 0,15 mm, como mostra a Figura 6.19. Para melhor visualização, a Figura 6.19(b) mostra uma ampliação da Figura 6.19(a) que comprova a presença do fotossensibilizador na espessura de 0,15 mm, curva de cor amarela.

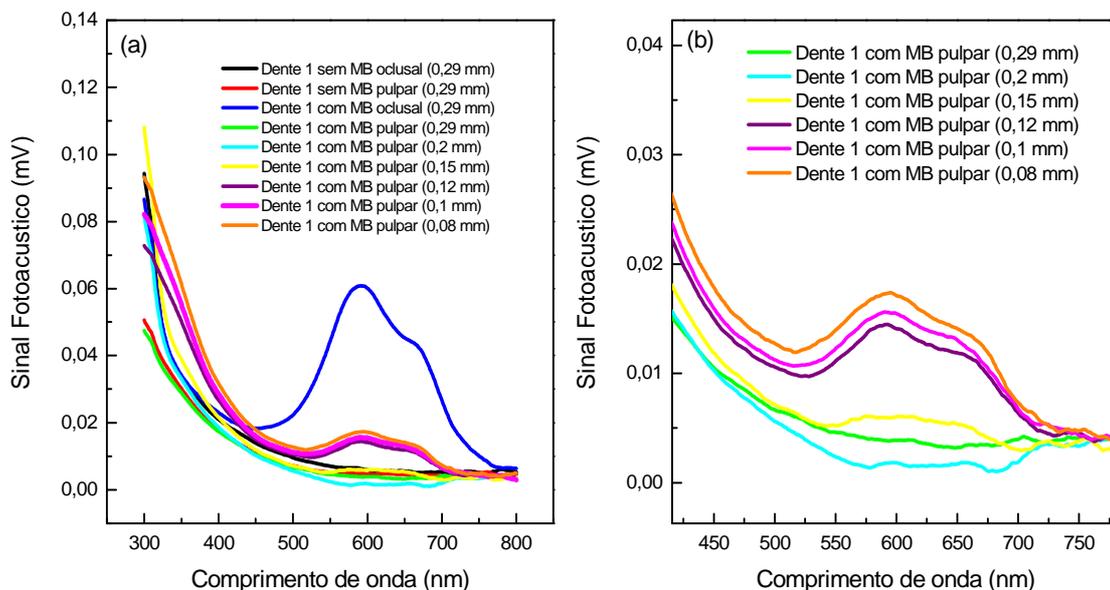


Figura 6.19 – Evolução dos espectros fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MB a 0,1 mg/mL. As medidas foram realizadas após 1 min de aplicação do FS.

Para o intervalo de tempo de 1 min temos que a profundidade de penetração de MB foi de 90 μm , o que equivale, aproximadamente, a metade do valor obtido para os experimentos realizados após 5 e 30 min. Apesar disso, o resultado é muito significativo tendo em vista que embora o intervalo de tempo fosse curto, ocorreu a penetração do fotossensibilizador.

Para o fotossensibilizador azul de *o*-toluidina (TBO) o procedimento adotado foi o mesmo empregado para o azul de metileno. A Figura 6.20 mostra os espectros

de absorção obtidos para a amostra 1, de dentina, com aplicação de TBO a 0,1mg/mL. A medida foi realizada 30 min após a aplicação. A espessura inicial das três amostras avaliadas nesse grupo foi de aproximadamente 0,29 mm e o pico de absorção máxima do TBO apresentou-se em 570 nm. O TBO foi detectado na espessura de 0,19 mm na amostra, portanto a profundidade de penetração encontrada foi da ordem de 130 μm .

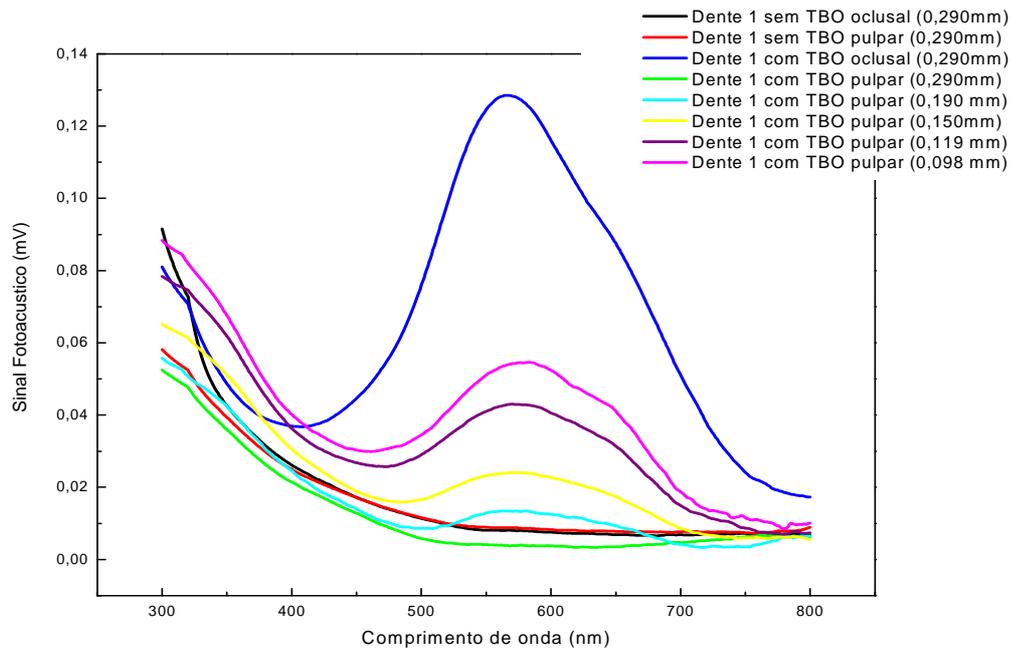


Figura 6.20 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de TBO a 0,1mg/mL. Medidas realizadas 30 min após a aplicação do FS.

A Figura 6.21 mostra os resultados para a amostra 1 com a medida realizada 5 min após a aplicação do fotossensibilizador. As espessuras iniciais das três amostras avaliadas foram de aproximadamente 0,3 mm. Na amostra 1, o TBO foi detectado na espessura de 0,20 mm, e o valor médio encontrado para esse grupo de amostras foi de 0,22 mm. Assim a profundidade de penetração atingida pelo TBO com exposição de 5 minutos na dentina foi de aproximadamente 160 μm . O comportamento da permeação do TBO foi obtido de forma análoga ao realizado para o azul de metileno. A equação (6.1) foi utilizada para ajustar os dados obtidos para as áreas das bandas de absorção em função da espessura da amostra. A Figura 6.22 mostra a dependência das áreas em função da espessura da dentina. Estas áreas foram obtidas dos espectros da Figura 6.21.

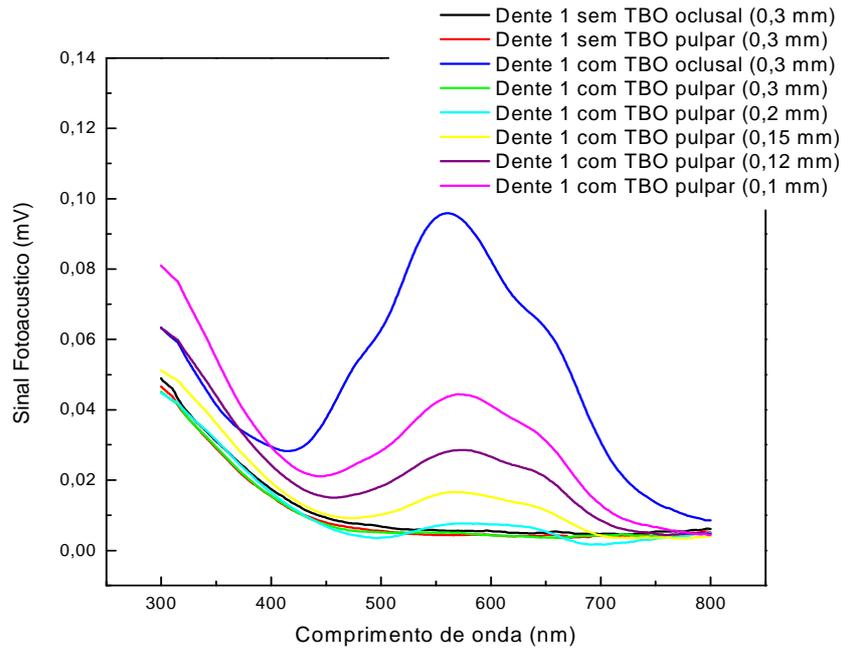


Figura 6.21 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de TBO a 0,1mg/mL. Medidas realizadas 5 min após a aplicação do FS.

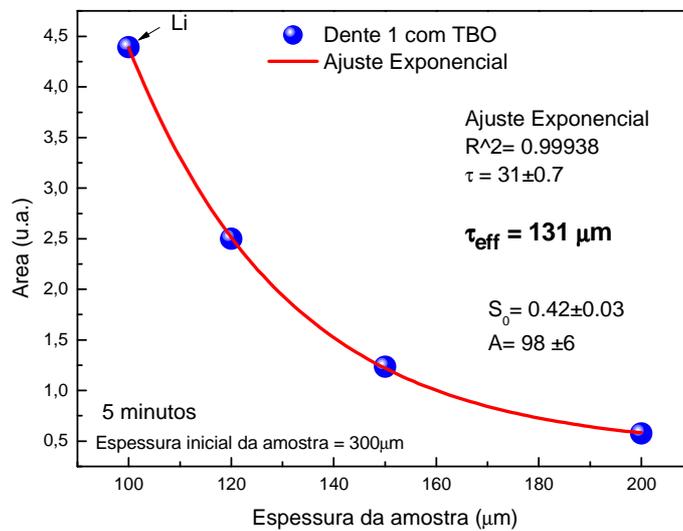


Figura 6.22 – Áreas dos espectros de absorção do TBO em função da espessura da amostra.

O valor do parâmetro de ajuste, τ , encontrado foi de $(31 \pm 0.7) \mu\text{m}$. Considerando o ponto inicial ($\text{Li} = 100 \mu\text{m}$), temos que o τ efetivo (τ_{eff}) para o TBO com a medida realizada 5 min após a aplicação do FS, foi de $131 \mu\text{m}$. Portanto para o valor de 1τ , temos que a concentração de TBO é reduzida a $1/e$ ou 63% do seu valor inicial, restando em $131 \mu\text{m}$ de espessura aproximadamente 37% da concentração do FS

em relação à quantidade detectada na amostra na espessura (Li). Novamente, repetindo o procedimento adotado para as outras amostras, obteve-se o valor médio de τ de aproximadamente 43 μm para as medidas realizadas 5 e 30 min após a aplicação do FS. Considerando a menor espessura analisada ($Li=100\ \mu\text{m}$), a estimativa mostra que 37% do azul de o-toluidina foi detectado na profundidade de 143 μm em relação a quantidade presente em Li.

A Figura 6.23 mostra os espectros obtidos 1 min após a aplicação do azul de o-toluidina. A espessura inicial da amostra foi de 0,25 mm e o TBO foi detectado em 0,15 mm, como mostra a Figura 6.23(b).

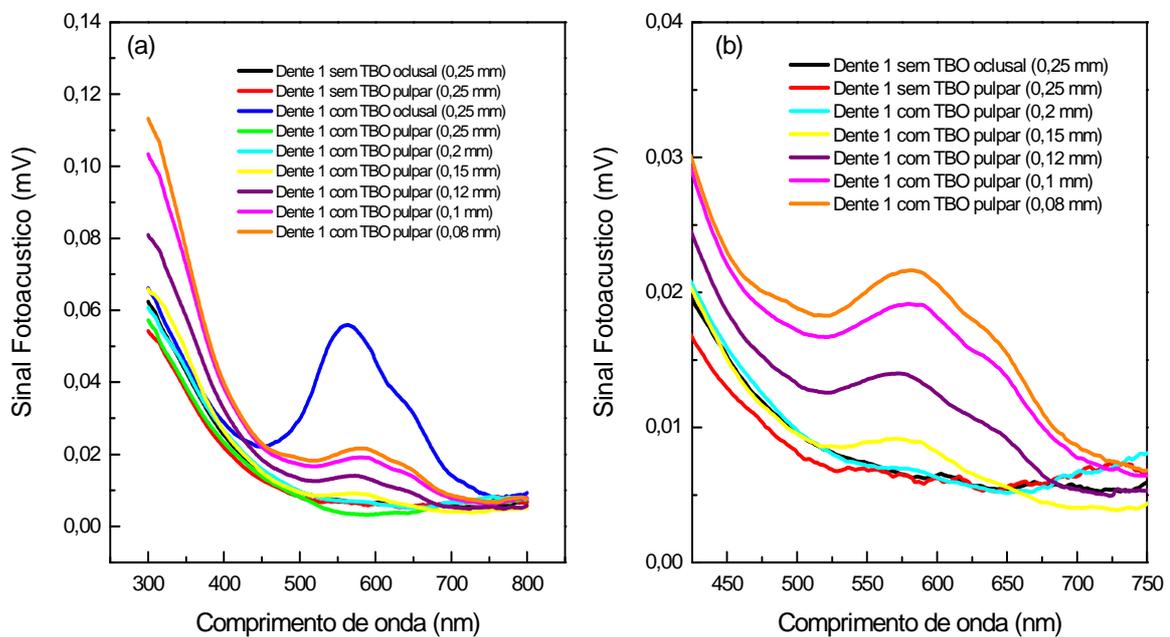


Figura 6.23 – Evolução dos espectros fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do TBO a 0,1 mg/mL. Medida realizada 1 min após aplicação FS.

A profundidade de penetração do TBO na dentina com período de aplicação de 1 min foi de 90 μm , sendo μ_s igual a 60 μm . Apresentando, portanto, o mesmo valor encontrado para o azul de metileno sob as mesmas condições.

O próximo fotossensibilizador analisado foi o verde malaquita (MG). A Figura 6.24 mostra os resultados das medidas realizadas 30 min após a aplicação. A espessura inicial das três amostras avaliadas foi de aproximadamente 0,34 mm e o pico de absorção máxima em 622 nm. Na amostra 2, a detecção do MG ocorreu em

0,20 mm, e o valor médio encontrado para as três amostras avaliadas foi de 0,23 mm. A profundidade de penetração do MG para a amostra 2 foi de 140 μm , com μ_s igual a 60 μm .

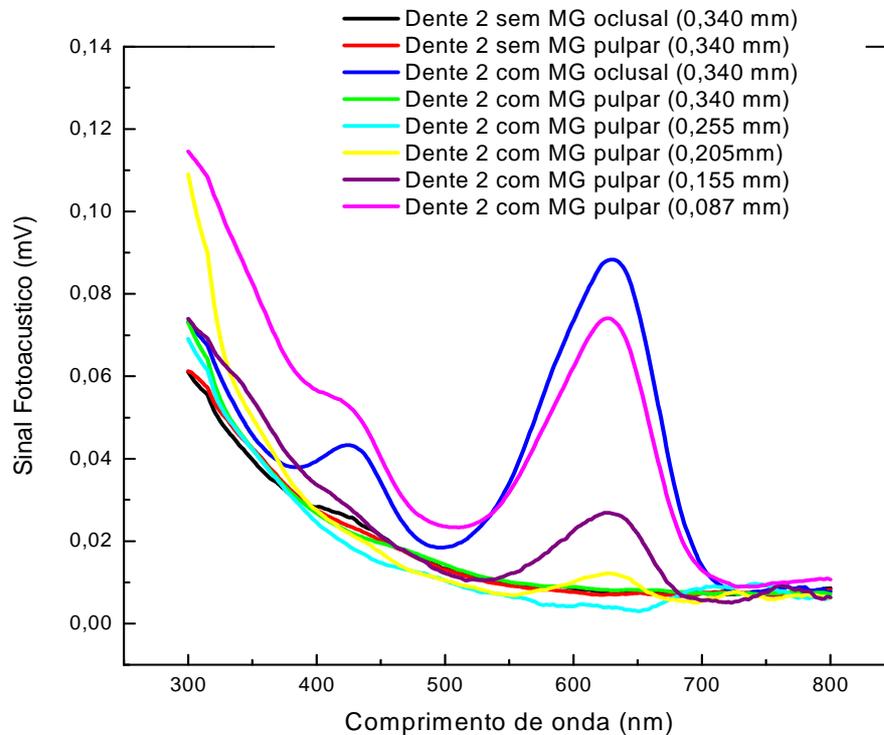


Figura 6.24 – Evolução dos espectros fotoacústicos em função da espessura da amostra. Medidas realizadas 30 min após a aplicação do MG a 0,1 mg/mL.

A Figura 6.25 mostra a evolução dos espectros de absorção em função da espessura da amostra 3 com as medidas realizadas 5 min após a aplicação. Neste caso a espessura inicial avaliada foi de 0,3 mm. Nota-se que o fotossensibilizador foi detectado na espessura de 0,2 mm. O valor médio da primeira espessura de detecção encontrado para as três amostras avaliadas foi de 0,18 mm. Portanto, a profundidade de penetração foi de no mínimo 120 μm .

A equação (6.1) foi novamente utilizada para avaliar a permeação do fotossensibilizador ao longo da amostra de dentina. A Figura 6.26 mostra a estimativa da porcentagem de verde de malaquita que permeia em função da espessura da dentina na amostra 2 para o intervalo de tempo de 30 min. O parâmetro de ajuste, τ , encontrado foi de aproximadamente (64 ± 6) μm , resultando em um τ efetivo (τ_{eff}) de 151 μm , já que o ponto inicial L_i , foi obtido para a espessura de 87 μm .

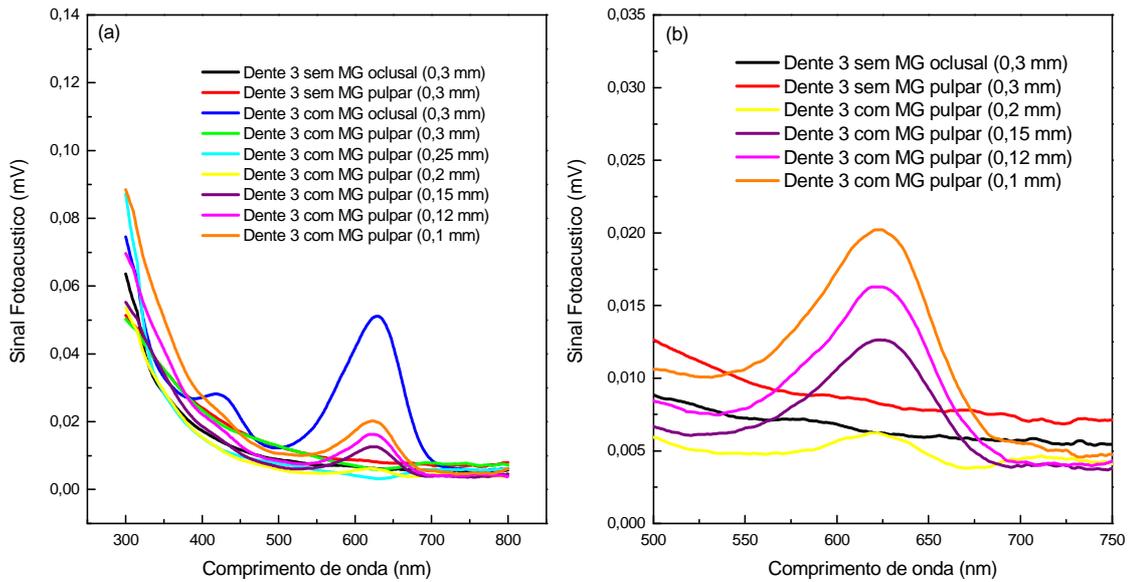


Figura 6.25 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de MG a 0,1mg/mL. Medidas realizadas 5 min após a aplicação.

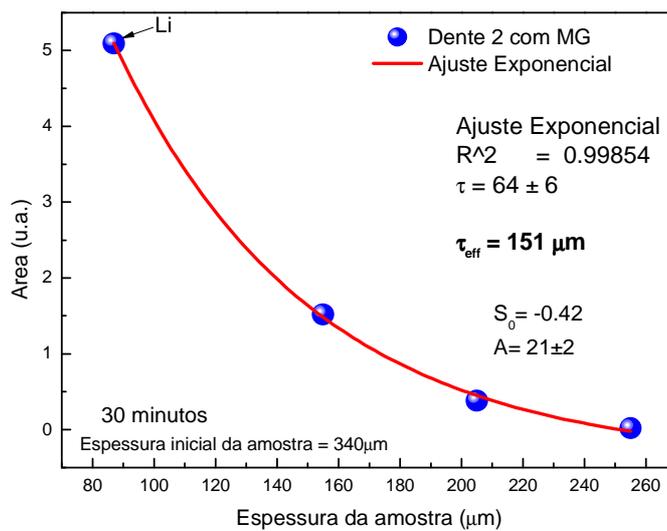


Figura 6.26 – Áreas dos espectros de absorção da amostra de dentina com aplicação de MG a 0,1mg/mL. Medidas realizadas 30 min após a aplicação.

O valor médio encontrado para todas as amostras que receberam a aplicação desse FS foi de aproximadamente 48 μm para o ajuste obtido a partir das áreas do sinal fotoacústico. Considerando a menor espessura analisada (Li~100 μm), referente ao primeiro ponto avaliado, estima-se que 37% da concentração inicial em Li do verde de malaquita (MG) está presente em 148 μm de espessura da amostra. A Figura 6.27 mostra os resultados para as medidas que foram realizadas 1 min após a aplica-

ção do fotossensibilizador. A espessura inicial da amostra foi de 0,28 mm e o MG foi detectado em 0,15 mm. A profundidade de penetração também foi da ordem de 90 μm .

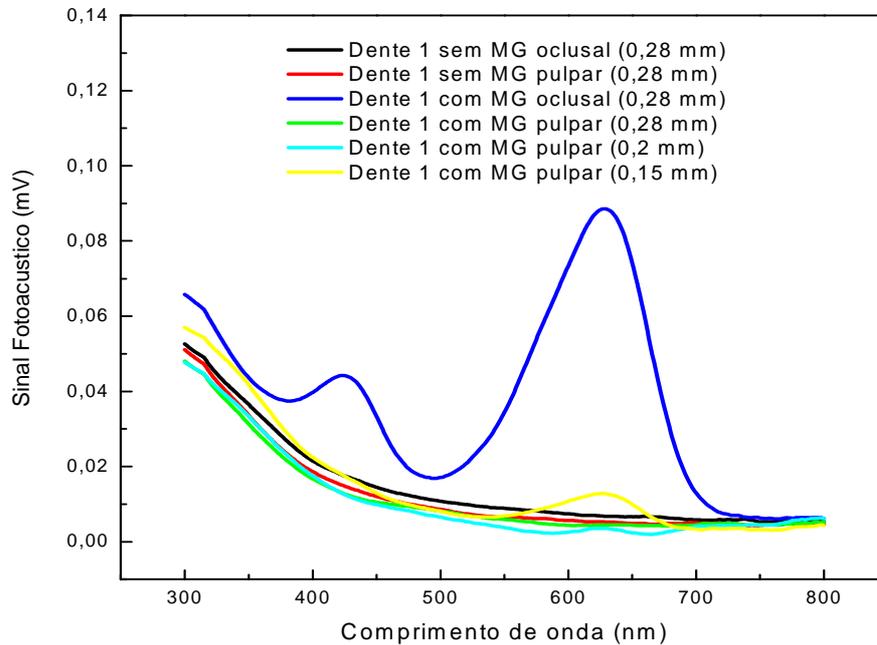


Figura 6.27 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de MG a 0,1mg/mL. Medidas realizadas 1 min após a aplicação.

Portanto, os resultados para os três fotossensibilizadores mostraram que a penetração já ocorre quando a medida é realizada 1 min após a aplicação. Isto indica que em termos de taxa de penetração os três são boas alternativas para uso na terapia fotodinâmica.

Todos os fotossensibilizadores (FS) independente do período de exposição apresentaram permeação através do tecido dentinário quando utilizada a concentração de 0,1mg/mL. Para verificar se esse comportamento se repetiria para uma menor concentração do FS, foram realizados experimentos utilizando-se uma concentração de 0,01mg/mL, com tempo de exposição de 5 minutos para todos os FS.

O primeiro FS estudado foi o azul de metileno. A solução preparada na concentração de 0,01 mg/mL ficou com coloração muito clara. Mesmo quando a amostra atingiu uma espessura muito fina (80 μm) a banda de absorção do MB não foi detectada no lado pulpar. A espessura inicial da amostra foi de 0,2 mm e o MB também não pode ser detectado na superfície contrária àquela em que fora aplicado, como mostra a Figura 6.28.

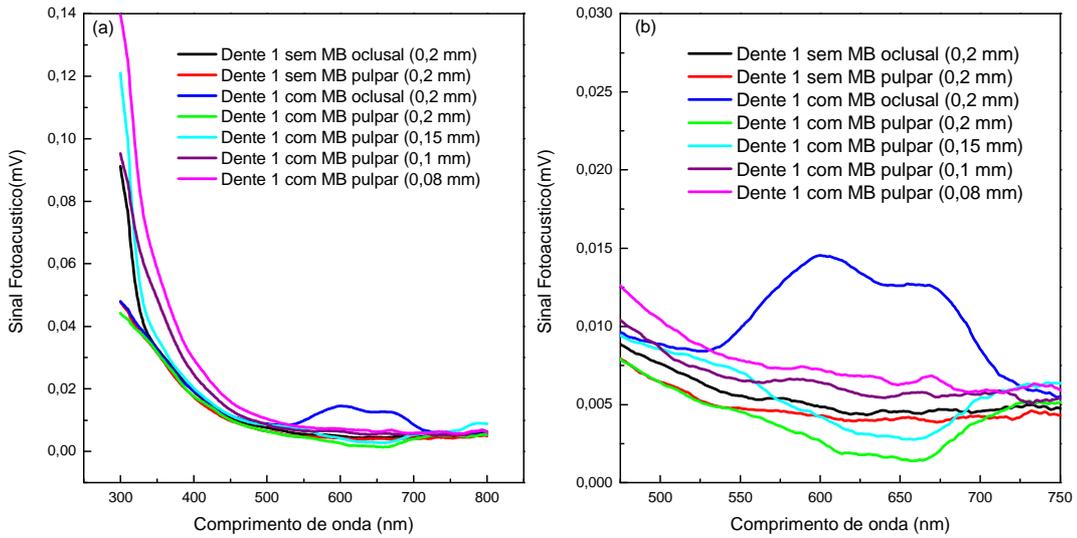


Figura 6.28 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de MB a 0,01mg/mL. Medidas realizadas 5 min após a aplicação.

O mesmo comportamento foi observado para o azul de o-toluidina. A espessura inicial da amostra foi de 0,3 mm e o fotossensibilizador não foi detectado na superfície pulpar da amostra, nem mesmo com espessura de 60 μm . Os espectros de absorção para as amostras com aplicação de TBO a 0,01 mg/mL com período de exposição de 5 minutos estão apresentados na Figura 6.29.

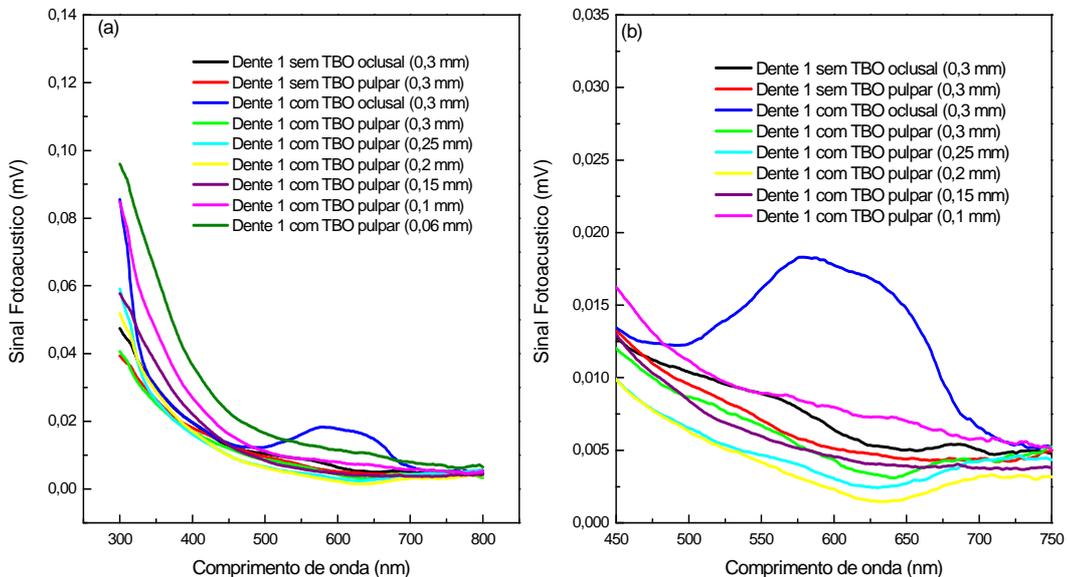


Figura 6.29 – Espectros fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de TBO a 0,01mg/mL. Medidas realizadas 5 min após a aplicação.

A leitura da amostra utilizada para avaliar a permeação do verde de malaquita a 0,01 mg/mL com período de exposição de 5 min encontra-se na Figura 6.30.

A mesma limitação foi encontrada em relação à essa concentração, como ocorreu com os outros fotossensibilizadores. A espessura inicial da amostra foi de 0,2 mm e o MG não foi detectado na superfície pulpar, em nenhuma das espessuras obtidas. A menor espessura possível atingida foi de 0,06 mm. Nessa espessura, após realizar as leituras da superfície pulpar em frequência de 16 Hz, realizou-se também, uma leitura da superfície oclusal com frequência de modulação da luz de 40 Hz para verificarmos se o fotossensibilizador ainda estava presente na amostra, no lado em que foi aplicado. Com o aumento da frequência ocorre uma diminuição do comprimento de difusão térmica (μ_s), conseqüentemente a espessura de prova da amostra testada é menor. Para esta frequência o μ_s é da ordem de 40 μm .

Por meio do espectro pode-se observar a ausência da banda de absorção do MG, para o espectro obtido ao final das leituras com frequência ajustada em 40 Hz. Este resultado é diferente do observado para a leitura realizada logo após a aplicação do MG, com espessura da amostra de 0,2 mm e frequência de modulação de 16 Hz. Este fato e os observados anteriormente sugerem que ou a técnica não foi sensível o suficiente para a detecção, ou o fotossensibilizador foi removido da superfície oclusal à medida que a amostra foi manipulada para a remoção da espessura. Assim, não foi possível detectar o fotossensibilizador quando a menor concentração foi utilizada.

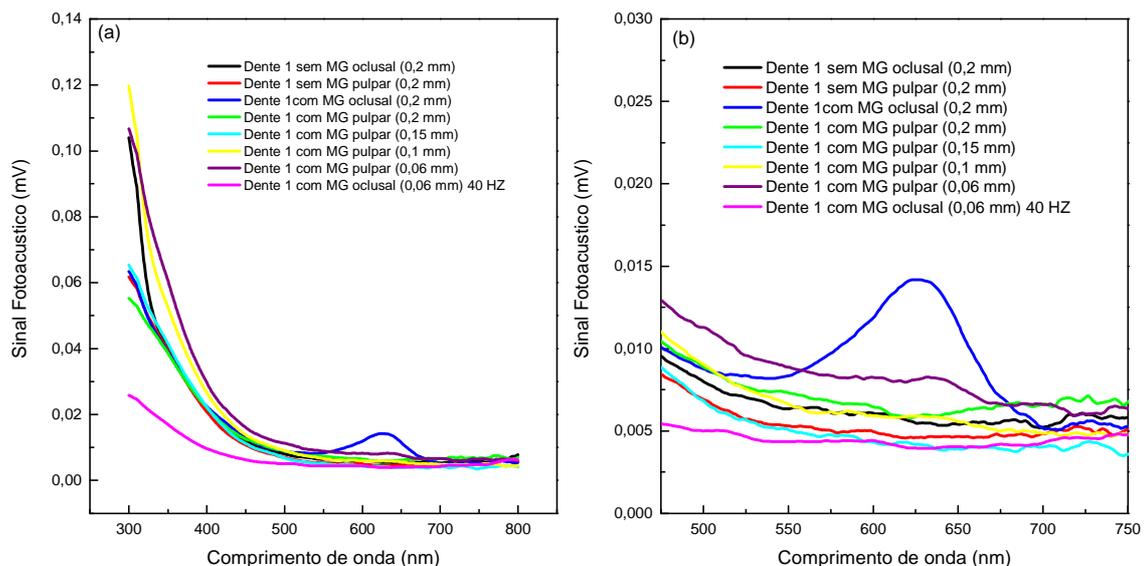


Figura 6.30 – Espectro fotoacústicos da amostra de dentina com aplicação de MG a 0,01mg/mL. Medidas iniciadas 5 minutos após a aplicação do FS.

A Tabela 6.2 mostra as primeiras espessuras de detecção dos fotossensibilizadores (FS) e a Tabela 6.3 as médias dos valores encontrados para as primeiras espessuras de detecção em função do FS e do período de tempo de exposição utilizados, bem como os valores de τ encontrados por meio do ajuste das áreas das bandas de absorção.

Tabela 6.2 – Primeiras espessuras de detecção (mm) encontradas para cada amostra avaliada.

	Primeira espessura(l) de detecção do FS ($\pm 0,001$)mm								
	Amostras 1,2 e 3 com MB			Amostras 1,2 e 3 com TBO			Amostras 1,2 e 3 com MG		
0,1 mg/mL 30 minutos	0,232	0,254	0,250	0,190	0,190	0,200	0,255	0,205	0,253
0,1 mg/mL 5 minutos	0,250	0,254	0,250	0,200	0,230	0,230	0,190	0,150	0,200
0,1 mg/mL 1 minuto	0,150	-	-	0,150	-	-	0,150	-	-
0,01 mg/mL 5 minutos	ND*	-	-	ND*	-	-	ND*	-	-

*ND – não detectado

Tabela 6.3 – Média das espessuras de detecção (mm) encontradas para cada FS, períodos de tempo de exposição e média dos valores de τ (μm) de cada FS testado.

	Média das espessuras de detecção do FS (mm)		
	MB	TBO	MG
0,1 mg/mL 30 minutos	0,245	0,193	0,237
0,1 mg/mL 5 minutos	0,251	0,220	0,180
Média do valor de τ para todas as amostras	64 μm	43 μm	48 μm

De acordo com os resultados obtidos observou-se uma pequena variação na espessura de detecção dos fotossensibilizadores para os períodos de exposição de 5 e 30 minutos. Isto indica que o tempo de exposição, para esta ordem de grandeza, não influenciou na permeabilidade destes através da estrutura dentinária. No período de tempo de 1 minuto os três fotossensibilizadores empregados tiveram comportamento de permeação semelhante, com espessura de detecção de 0,15 mm.

Analisando os resultados obtidos a partir do ajuste exponencial das áreas formadas pelos sinais fotoacústicos, observou-se que os valores médios de τ encontrados para o azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita diferi-

ram. O azul de metileno alcançou o maior índice uma vez que os resultados estimaram que 37% desse FS está presente em 64 μm de espessura em relação à menor espessura observada, que neste caso foi da ordem de 100 μm . Portanto, em 164 μm de espessura da amostra a concentração do MB foi reduzida de 63% em relação a quantidade inicial presente em 100 μm . O verde de malaquita e o azul de *o*-toluidina apresentaram um índice menor de permeação, pois os resultados estimaram que 37% desses fotossensibilizadores estão respectivamente presentes em 48 e 43 μm de espessura a partir da menor espessura analisada. Entretanto, é importante salientar que o objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de permeação e o comportamento da penetração dos fotossensibilizadores (FS) na dentina, e não selecionar um FS. Para que fosse possível fazer comparações diretas entre os FS e apontar o mais eficiente para a aplicação na terapia fotodinâmica, seriam necessários mais experimentos com um número maior de amostras que possibilitassem uma análise estatística dos dados.

A Figura 6.31 representa uma estimativa do comportamento da concentração encontrada para os três fotossensibilizadores avaliados em função da espessura da amostra de dentina, considerando o valor médio de τ obtido para cada fotossensibilizador. A cada valor de τ considerado uma porcentagem da concentração inicial pode ser relacionada àquela espessura analisada. Por exemplo, se considerarmos o MB, tem-se que na espessura de 1τ , ou seja, 64 μm estima-se que restam ainda 37% da concentração inicial presente na menor espessura analisada, para 3τ (292 μm) esse valor se reduz a 5%. A estimativa da porcentagem de concentração foi obtida variando-se o valor de τ de 1 a 5. Os resultados foram apresentados em função da espessura da amostra para os fotossensibilizadores utilizados. Apesar de apresentarmos os resultados da média dos valores de τ para cada fotossensibilizador, novamente reforçamos que não pretendemos compará-los, apenas mostrar o perfil de distribuição dessas substâncias ao longo da dentina. Assim fizemos uma média geral entre os FS utilizados e estimamos percentualmente a concentração dos fotossensibilizadores em função da espessura da amostra, da mesma forma que obtivemos para cada um individualmente, como mostra a Figura 6.32. A média geral de τ obtido foi de aproximadamente 53 μm .

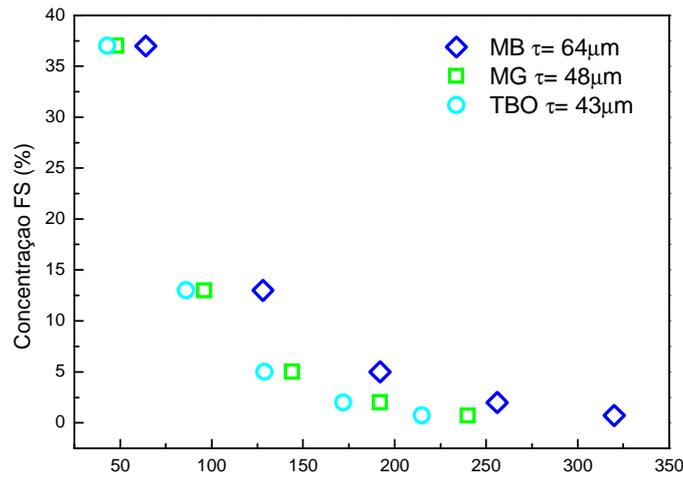


Figura 6.31 – Comportamento da concentração do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita em função da espessura da amostra de dentina de acordo com o valor de τ encontrado para cada FS.

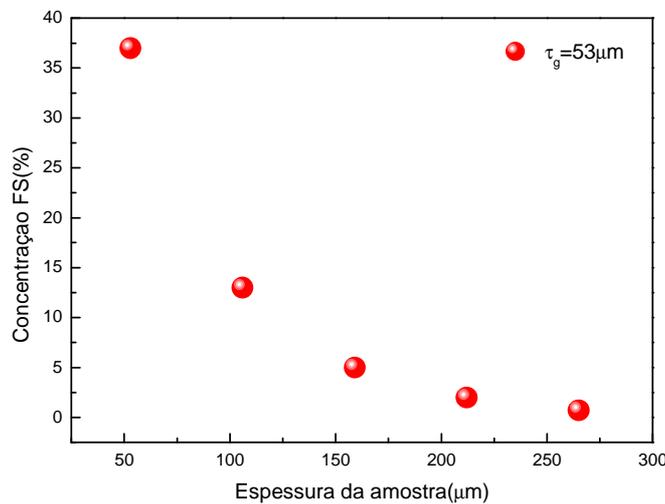


Figura 6.32 – Comportamento da concentração dos FS em função da espessura da amostra de dentina de acordo com o valor geral de τ encontrado a partir da média dos valores de τ de cada FS.

Também é importante considerar a aplicabilidade da terapia fotodinâmica (PDT) sobre a cárie instalada, uma vez que nessa condição há a presença de microrganismos específicos que possuem certa capacidade de permeação. O intuito da aplicação da PDT é atingir a profundidade alcançada por esses microrganismos e inviabilizá-los. De acordo com a espécie, o tempo de instalação da doença e a região da dentina afetada pelas bactérias foram encontradas em até 500 μm de distância de sua fonte de infecção ^[70]. O *Streptococcus*, que é uma espécie potencialmente cariogênica, foi encontrado em 200 μm de profundidade ^[83]. De acordo com os resultados do presente estudo, todos os fotossensibilizadores analisados com exposição de 5 e

30 minutos, seriam capazes de atingir a profundidade em que o *Streptococcus* foi encontrado. Viabilizando, portanto, a aplicação dessas substâncias como agentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica para tratamento auxiliar da doença cárie.

Outro fator importante é relacionar a concentração do fotossensibilizador (FS) utilizado e a sua influência na efetividade da PDT. A formação de agregados modifica o espectro de absorção do agente fotossensibilizador e suas propriedades fotofísicas, que pode influenciar na sua ação como um fotossensibilizador^[70]. O estado agregado geralmente ocorre com o aumento da concentração do FS, especialmente em corantes hidrofóbicos, que passam de monômeros para dímeros ou formas auto-agregadas. Em baixas concentrações, a forma monomérica predomina e o espectro do FS possui uma banda de absorção predominante, mas com o aumento da concentração, pode ocorrer o aparecimento de uma banda adicional e a absorção do FS pode ser modificada^[70]. Isto explica as mudanças apresentadas no espectro de absorção dos fotossensibilizadores isolados com concentração de 0,001 mg/mL, em comparação com os espectros obtidos em dentina com concentração de 0,1 mg/mL, em que foi observado a presença de uma banda adicional ao espectro. Para o azul de toluidina em concentrações superiores a 0,01 mg/mL ocorre predominância de agregados, e para o azul de metileno esse fato ocorre em concentrações superiores a 0,0003 mg/mL^[84]. Na forma monomérica a máxima absorção do MB ocorre no comprimento de onda de 660 nm, enquanto que no seu estado agregado essa máxima absorção ocorre em 610 nm. O TBO na forma monomérica possui máxima absorção em 630 nm, e em seu estado agregado ela ocorre em 590 nm^[84]. Dessa maneira, deve-se correlacionar a concentração do FS utilizado e o estado das moléculas desse FS com a capacidade de absorção no comprimento de onda adequado.

De acordo com o que apresentamos até agora, vimos que os fotossensibilizadores (FS) estudados seriam capazes de atingir uma espessura do tecido dentinário, em que um dos principais microorganismos, presentes na dentina cariada, poderia ser encontrado. No entanto para que o FS tenha efeito bactericida sob as espécies cariogênicas, é necessário que ele seja ativado por uma fonte de luz. Assim seria interessante avaliar a penetração da luz ao longo da estrutura dentinária, com a finalidade de sabermos se a luz atingirá uma espessura suficiente para ativar o FS. Isto será avaliado na próxima seção.

6.3 Transmitância de luz através da dentina humana

Para estimarmos o comportamento de penetração da luz através da dentina, utilizamos os resultados de dois trabalhos encontrados na literatura.

Manly e colaboradores ^[85] mencionaram em seu trabalho que na transmitância da luz através de alguns materiais, as partículas relativamente grossas presentes, causam um espalhamento considerável da luz em comparação com a absorção. Em que os dados são empiricamente descrito por uma equação da forma:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = at^b \quad (6.2)$$

Sendo que I_0 e I representam as intensidades dos feixes incidente e transmitidos, respectivamente, a é o coeficiente de absorção óptica, t é a espessura da amostra, e b é uma constante empiricamente escolhida. As magnitudes dos coeficientes de absorção e espalhamento pode ser calculada a partir de uma série exponencial:

$$\frac{I_0}{I} = Pe^{\lambda t} + Qe^{-\lambda t} \quad (6.3)$$

em que P , Q e λ são constantes. E elas podem ser escritas em termos do coeficiente de espalhamento (s) e do coeficiente de absorção (k) da seguinte forma:

$$P = \frac{(\lambda + k)^2}{4\lambda k} \quad (6.4)$$

$$Q = -\frac{(\lambda - k)^2}{4\lambda k} \quad (6.5)$$

$$\lambda = \sqrt{k(k + s)} \quad (6.6)$$

Substituindo as equações (6.4) (6.5) (6.6) em (6.3), tem-se:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{(\lambda + k)^2 e^{\sqrt{k(k+s)}t} - (\lambda - k)^2 e^{-\sqrt{k(k+s)}t}}{4k\sqrt{k(k+s)}} \quad (6.7)$$

Na Eq.(6.7) se observa a dependência entre a luz transmitida através da amostra em função do espalhamento e da absorção pelo material. Embora o espalhamento nas superfícies da dentina não são comparáveis diretamente com as partículas dos materiais citados, como por exemplo a de determinado tipo de vidro, as equações apresentadas acima podem ser utilizadas para estimar como o espalhamento e a absorção influenciam na transmitância de luz através do tecido dentinário. Segundo o autor a dispersão é cerca de três centenas de vezes tão importante como a absorção na diminuição da fração de luz transmitida pela dentina normal.

Para avaliarmos a penetração da luz através da dentina vamos utilizar a equação(6.7). No entanto, precisamos saber qual é o coeficiente de absorção óptica e o de espalhamento para a dentina humana. Os valores foram obtidos do trabalho de Bosch e colaboradores^[86] e estão apresentados Figura 6.33. Mantivemos aqui as nomenclaturas do trabalho, sendo A o coeficiente de absorção óptica e S o de espalhamento.

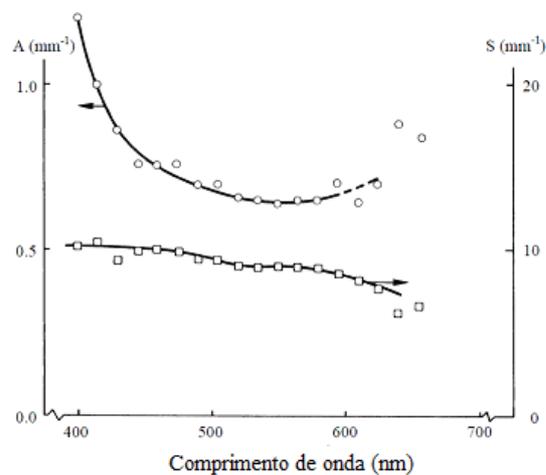


Figura 6.33 – Exemplos da dependência espectral do coeficiente de absorção óptica e do espalhamento da dentina^[86].

Manly^[85] utilizou as equações mostradas acima para calcular os coeficientes (s) e (k), no entanto eles não estão em função do comprimento de onda como no caso de Bosch, que possibilita que calculemos a transmitância em um determinado comprimento de onda específico.

Assim, simulamos a intensidade de luz transmitida através da dentina para quatro comprimentos de onda da luz incidente, que estão na região espectral de

interesse para o nosso trabalho, a de absorção dos corantes. Visto que para o fotosensibilizador apresentar efeito bactericida satisfatório ele deve ter picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz. Os dados utilizados para efetuarmos a simulação estão dispostos na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 – Parâmetros utilizados para a simulação da transmitância da luz através da dentina humana.

$k (mm^{-1})$	$s (mm^{-1})$	λ	P	Q	$\Lambda (nm)$
0,86	9,39	2.96901	1.4355	-0.4355	450nm
0,76	9,97	2.85566	1.5059	-0.5059	465nm
0,66	9,71	2.61614	1.55403	-0.55403	532nm
0,64	8,18	2.37588	1.49542	-0.49542	615nm

Os valores de (s) e (k) foram obtidos da Figura 6.33 [86]. As constantes P , Q e λ foram calculadas a partir das equações (6.4) (6.5) e (6.6). A Figura 6.34 mostra a intensidade da luz transmitida em função da espessura da amostra para os comprimentos de onda da luz desejados.

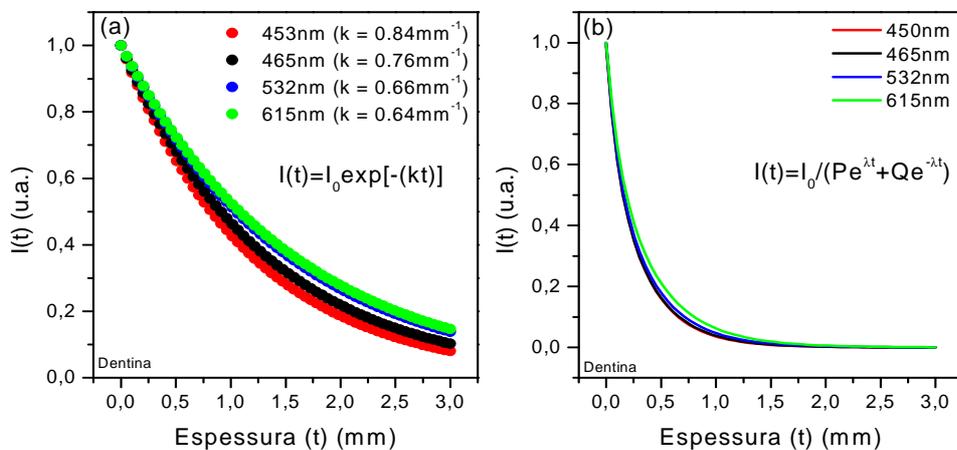


Figura 6.34 – Intensidade da luz transmitida em função da espessura da amostra: (a) considerando apenas a absorção por meio da lei de Beer; (b) considerando a influência da absorção e do espalhamento por meio da equação (6.7).

Observando a Figura 6.34 podemos avaliar como o espalhamento interfere na transmitância de luz através da dentina. A intensidade do feixe transmitido é reduzida rapidamente quando o espalhamento é considerado. Por exemplo, em $t=0,5$ mm de espessura a intensidade $I(t)$, para o comprimento de onda de 615 nm, é atenuada em aproximadamente 79% com relação à intensidade inicial quando considerada a con-

tribuição do espalhamento e da absorção. É reduzida em apenas 27% quando considerada apenas a contribuição da absorção. Embora o espalhamento dificulte a penetração da luz ao longo da estrutura dentinária, a simulação obtida mostrou que a luz atinge uma espessura de dentina suficiente para irradiar os fotossensibilizadores, uma vez que a maior espessura de detecção dos mesmos foi da ordem de 0,25 mm.

Conhecido o comportamento de distribuição dos fotossensibilizadores e da luz através da estrutura dentinária é possível estimar a porcentagem de FS e luz em uma determinada profundidade de dentina com relação à quantidade presente na superfície da amostra. Como exemplo, simulamos na Figura 6.35 a distribuição do FS segundo a equação (6.1), $S(L) = S_0 + A \cdot \exp^{(-L/\tau)}$, e a penetração da luz a partir da equação (6.3), $I(L) = I_0 / (P e^{\lambda L} + Q e^{-\lambda L})$, para diferentes profundidades (L) de dentina. Para tal simulação consideramos $S_0 = 0$, $A = 1$ e $\tau = 53 \mu m$ correspondente ao valor médio de τ encontrado entre todos os FS analisados. E para os parâmetros I_0 , P , Q e λ foram utilizados os valores apresentados na Tabela 6.4, correspondentes ao comprimento de onda da luz fixado em 615 nm. Em que consideramos $I_0 = P + Q$ para que o gráfico fosse normalizado. Na Figura 6.35(a) está o resultado para a simulação, os quadrados vermelhos correspondem a penetração da luz dada pela intensidade do feixe de luz transmitido ($I(L)$) através da dentina. E os círculos azuis a concentração do fotossensibilizador $S(L)$. A Figura 6.35 (b) mostra um desenho esquemático do dente ilustrando por meio do retângulo pontilhado a região da dentina em que seria aplicado o fotossensibilizador para o tratamento da cárie utilizando a terapia fotodinâmica. A seta azul, na direção x, indica a orientação em que o FS seria aplicado e a seta vermelha, em y, a direção em que a luz incidiria sob a amostra para ativar o FS. Assim por meio da simulação obtida na Figura 6.35 (a) é possível avaliar em um determinado ponto (x, y), que está representado arbitrariamente pelo ponto em verde na Figura 6.35 (b), a porcentagem de FS e luz que estão chegando até esta profundidade no interior da dentina.

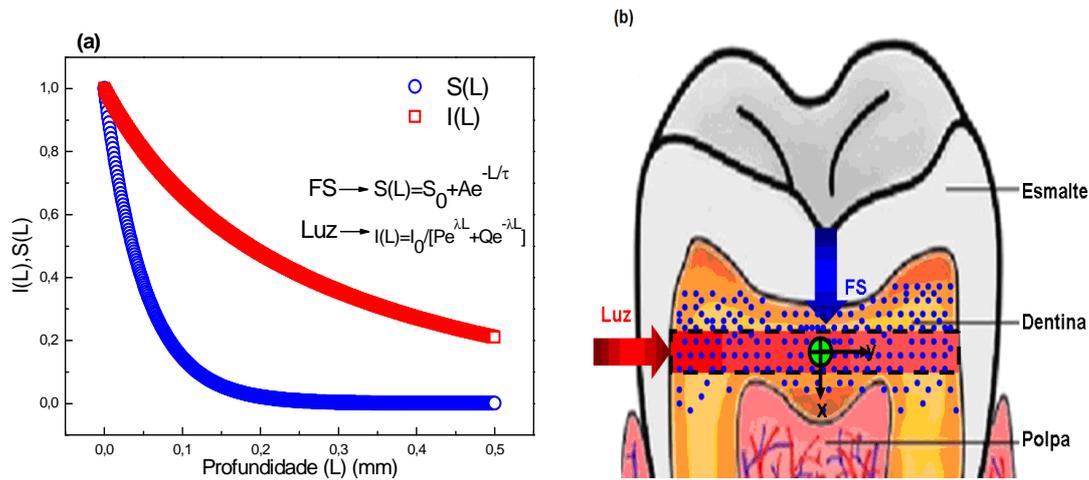


Figura 6.35 – Distribuição da concentração do fotossensibilizador, $S(L)$, e da intensidade do feixe de luz transmitido, $I(L)$, através da dentina humana.

A Figura 6.36 mostra por meio de um gráfico de densidade a distribuição do FS e penetração da luz, avaliadas na Figura 6.35, desde a superfície da amostra até uma profundidade de 200 μm de profundidade. As regiões com maior magnitude das cores representam as regiões em que estão presentes uma maior quantidade de corante e maior intensidade da luz. No lado esquerdo das figuras estão representadas alguns valores de profundidade em dentina, e a direita a porcentagem de FS e luz presentes nessas profundidades. Em que é possível avaliar, por exemplo, que em 0,1 mm de profundidade encontra-se 15% de FS em relação à quantidade presente na superfície da dentina, onde o FS fora aplicado. Já para a luz, estima-se que 66% da quantidade de luz incidente atingiria essa profundidade.

Por meio dessa simulação é possível comparar diretamente as duas distribuições, e identificar em uma determinada espessura de dentina a estimativa de concentração de corante e intensidade da luz. Este resultado seria interessante e aplicável na terapia fotodinâmica. Para o sucesso deste tratamento sob a dentina cariada, é necessário que o fotossensibilizador e a luz atinjam uma determinada espessura de dentina em que estariam presentes as bactérias da cárie. Assim, por meio da simulação obtida seria possível estimar se um fotossensibilizador e a luz em um determinado comprimento de onda estariam presentes nessa profundidade da dentina.

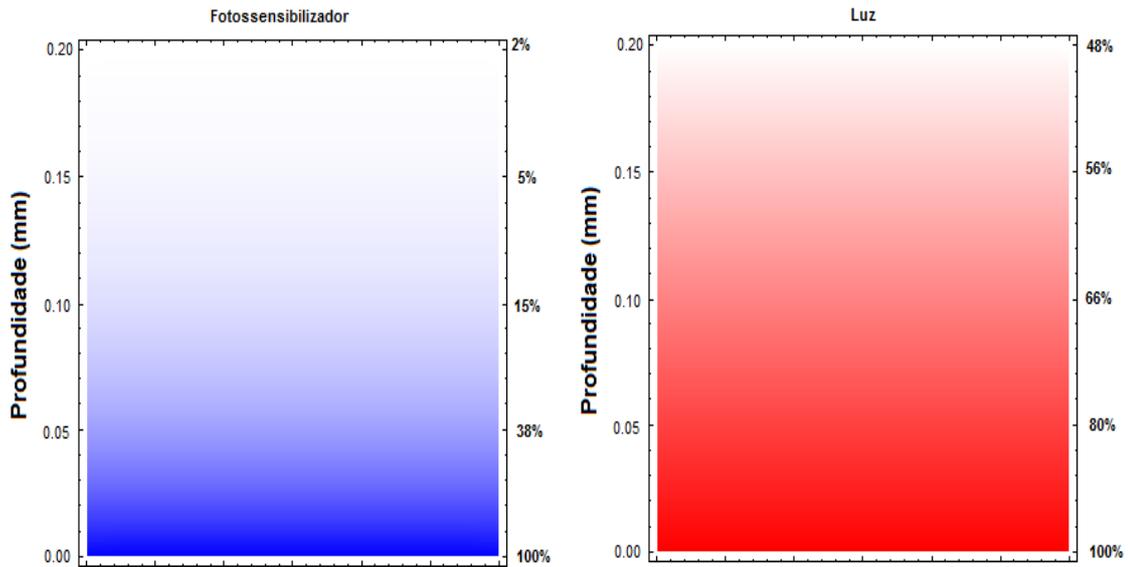


Figura 6.36 Distribuição da concentração do FS e transmitância da luz através da estrutura dentinária ^[70].

6.3.1 Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

A pesquisa sobre a permeabilidade dentinária a diferentes fotossensibilizadores foi realizada em parceria com o Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá. Assim outros experimentos foram realizados paralelamente aos desenvolvidos com a Espectroscopia Fotoacústica. A Mestra em Odontologia Ariane Ximenes Graciano realizou análises com a microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para obter informações sobre as propriedades da dentina e dos fotossensibilizadores utilizados no trabalho. A preparação das amostras e a descrição dos equipamentos utilizados nessas técnicas estão descritos na sua dissertação ^[70].

A Figura 6.37 mostra as imagens obtidas na MEV, utilizando-se um corte longitudinal no dente. Esta técnica foi utilizada para verificar as dimensões dos túbulos dentinários na região de dentina em que as amostras do estudo foram obtidas. A Figura 6.38 mostra as imagens obtidas em corte transversal.

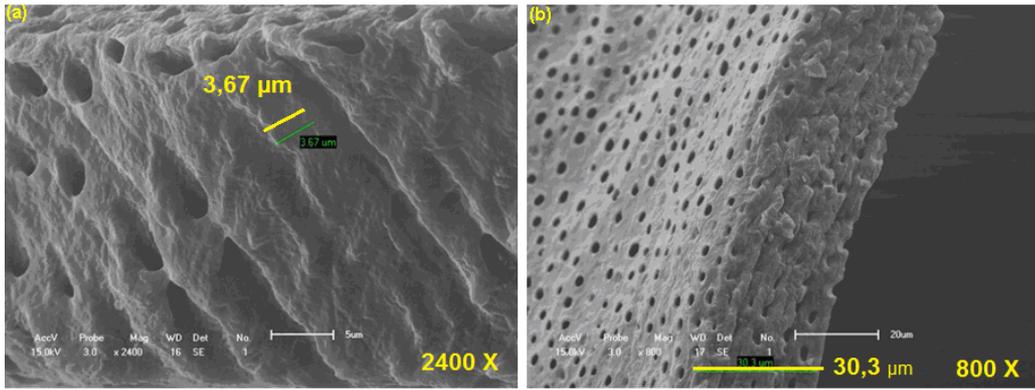


Figura 6.37 Imagens da dentina obtidas na MEV com corte longitudinal: (a) com aumento de 2400 vezes; (b) com aumento de 800 vezes^[70].

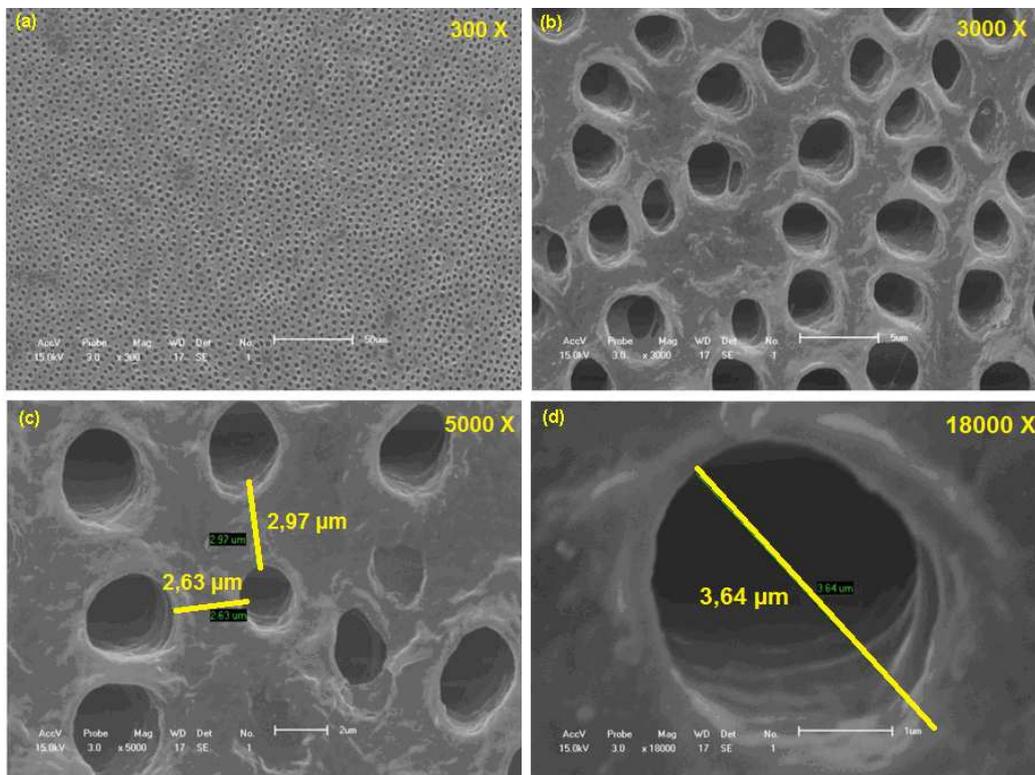


Figura 6.38 – Imagens da dentina obtidas na MEV com corte transversal: (a) corte transversal aumento de 300 vezes; (b) aumento de 3000 vezes; (c) aumento de 5000 vezes; (d) aumento de 18000 vezes^[70].

A média do diâmetro dos túbulos dentinários encontrada para as amostras utilizadas foi de 3,64 µm e a média da distância entre os túbulos de 2,8 µm. A espessura inicial das amostras logo após os cortes realizados foi de 100 µm, no entanto a média da espessura encontrada na MEV foi de 30,3 µm. A divergência entre os valores ocorreu provavelmente devido à desmineralização e tratamento dado às superfícies

para possibilitar a realização da técnica. Os túbulos dentinários encontrados na região em que as amostras foram obtidas apresentam características correspondentes às da dentina profunda, localizada próxima à câmara pulpar, ou seja, possuem um diâmetro maior comparado ao dos túbulos encontrados na região próxima ao esmalte dentário. O valor do diâmetro dos túbulos obtido pela MEV é compatível com os valores estimados para essa região. Obviamente, a permeabilidade dentinária é mais acentuada na região em que o diâmetro dos túbulos é maior, ainda assim essa região foi escolhida para ser testada por tratar-se de uma área crítica em que a terapia fotodinâmica atuaria como coadjuvante no tratamento conservador da cárie [70].

Para avaliação na microscopia óptica (MO) foram utilizadas três amostras obtidas em corte longitudinal. A MO foi empregada para visualizar a impregnação dos fotossensibilizadores utilizados nos túbulos dentinários, conforme mostra a Figura 6.39.

Assim, as imagens também mostram a penetração dos fotossensibilizadores azul de metileno (a) e (b), azul de o-toluidina (c) e (d) e verde de malaquita (e) e (f) nos túbulos dentinários.

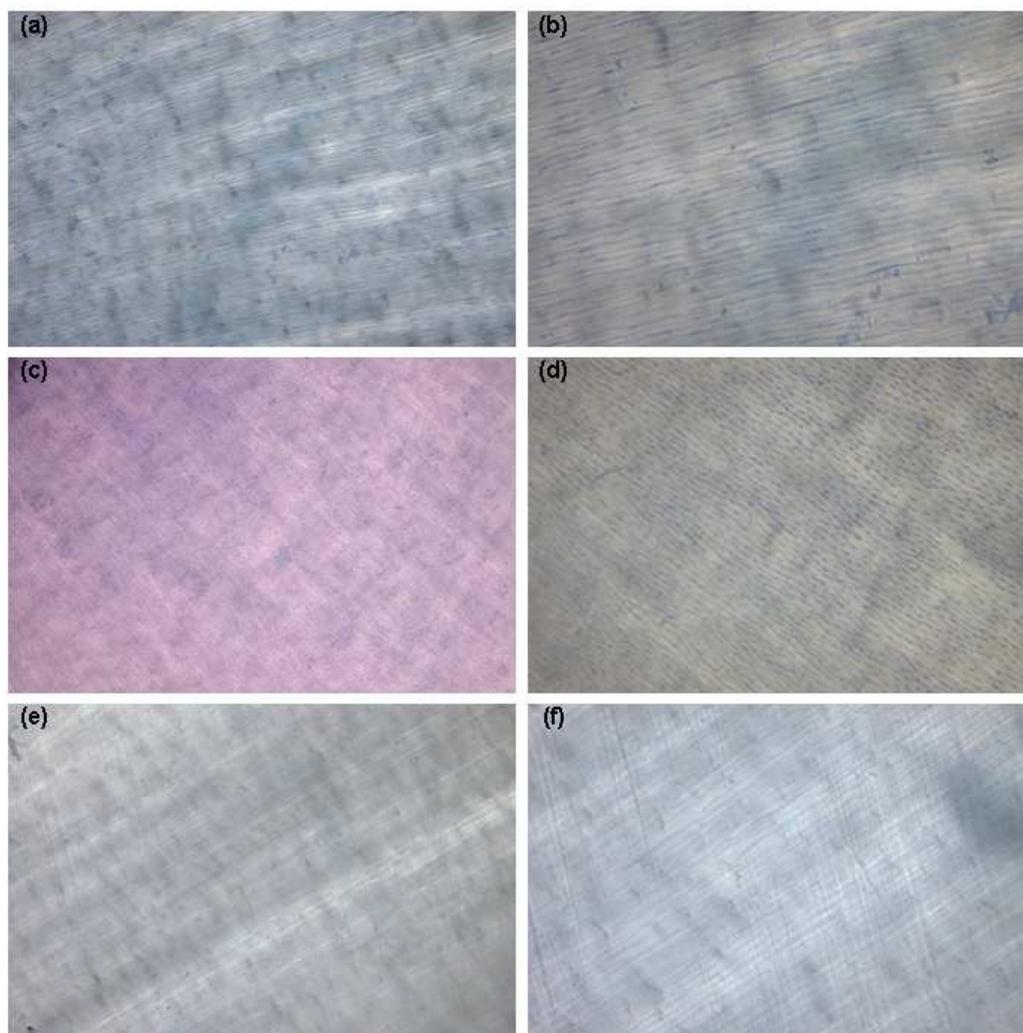


Figura 6.39 – Imagens obtidas em MO de amostras de dentina em cortes longitudinais mostrando a impregnação dos FS nos túbulos dentinários. (a) MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes; (b) MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes; (c) TBO 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes; (d) TBO 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes; (e) MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes e; (f) MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes^[70].

Conclusões

A partir dos resultados obtidos do primeiro estudo concluímos que a formulação com o complexo nanoencapsulado apresentou menor penetração na pele se comparada à da formulação com benzofenona-3 (BZ-3). Esta observação foi reforçada a partir da análise da fase do sinal fotoacústico, que permitiu separar as contribuições para o espectro provenientes das bandas de absorção óptica das formulações daquelas da pele. Com esta análise foi possível identificar dois centros absorvedores presentes nas amostras de pele com aplicação de BZ-3 e do complexo e um centro para a amostra com aplicação da base. Os resultados ainda sugerem a possível existência de um terceiro centro absorvedor superposto ao da pele para a amostra com aplicação do complexo. Assim, os resultados obtidos confirmaram a penetração da formulação através da pele permitindo realizar uma deconvolução espectral que evidenciou as bandas de absorção óptica atribuídas a cada centro absorvedor. Portanto, concluímos que o processo de nanoencapsulamento adotado pode ser uma alternativa na busca por novos protetores solares com menor taxa de difusão na pele e que ainda possam apresentar maior fotoestabilidade.

No segundo estudo, os resultados mostraram que os três fotossensibilizadores apresentaram alta taxa de permeação na dentina, inclusive quando o intervalo de tempo de aplicação foi da ordem de 1 min. Isto indica que em termos de taxa de difusão estes fotossensibilizadores são viáveis para uso prático na odontologia. Além disso, a partir destes resultados e do coeficiente de espalhamento de luz na dentina, propusemos um modelo semi quantitativo que permite prever a concentração do fotossensibilizador e a intensidade de luz nas diferentes profundidades ao longo da

dentina. Este modelo parece ser de grande valia para o aprimoramento dos protocolos utilizados na terapia fotodinâmica de interesse na odontologia.

Finalmente, os resultados deste trabalho mostraram mais uma vez que a Espectroscopia Fotoacústica é uma técnica muito importante para se determinar a penetração e a distribuição de formulações em sistemas biológicos, que em geral não são possíveis de serem obtidas com outros métodos, bem como uma ferramenta inovadora no estudo dos complexos de inclusão com as CDs.

Bibliografia

- [1] J.F. Nash. Human safety of ultraviolet filters and sunscreens products. *Dermatologic Clinics*, **24**, 35-51, (2006).
- [2] E. Shen, K.C. Silva, A.C. Bento, M.L. Baesso, S.L. Franco. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the potentiality of bee-propolis as UV protector: *In vivo* test in humans. *Journal De Physique IV, 13th ICPPP*, **125**, 681-683, (2005).
- [3] F. Pedrochi, E. Sehn, A.N. Medina, A.C. Bento, M.L. Baesso, A. Storck, J.L. Gesztesi. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin *in vivo*. *Journal De Physique IV, 13th ICPPP*, **125**, 757-759, (2005).
- [4] M.S.S.B. Monteiro. Filtros solares em nanocosméticos: desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, (2008).
- [5] K. Paese. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e a avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, (2008).
- [6] A. Beeby, A. E. Jones. The Photophysical properties of menthyl anthranilate: A UV-A sunscreen. *Photochemistry and Photobiology*, **72**, 10-15, (2000).
- [7] S. Kasichayanula, J.D. House, T. Wang, X. Gu. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. *Toxicology Applied Pharmacology*, **223**, 187-194, (2007).
- [8] G. Gonzalez, A. Farbrot, O. Larko. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. *Clinical and Experimental Dermatology*, **27**, 691-694, (2002).
- [9] N.R. Janjua, B. Kongshoj, A.M. Andersson, H.C. Wulf. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **22**, 456-461, (2008).
- [10] S. Simeoni, S. Scalia, R. Tursilli, H. Benson. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* human skin penetration and retention of the sunscreen agent, oxybenzone. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **54**, 275-282, (2006).
- [11] S.S. Milesi, S.S. Guterres. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. *Caderno de Farmácia*, **18**, 81-87, (2002).

- [12] M.S.S. Cunha-Filho, L.C.L. Sá-Barreto. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **28**, 1-9, (2007).
- [13] A. Vyas, S. Saraf, S. Saraf. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **62**, 23-42, (2008).
- [14] E.V. Chernykh, S.B. Brichkin. Supramolecular complexes based on cyclodextrins. *High Energy Chemistry*, **44**, 83-98, (2010).
- [15] L.A. Felton, C.J. Wiley, D.A. Godwin. Influence of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Transdermal Permeation and Skin Accumulation of Oxybenzone. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28**, 1117-1124, (2002).
- [16] K. Cal, K. Centkowska. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**, 467-478, (2008).
- [17] I. C. J. Zanin, R. B. Gonçalves, A. Brugnera Jr., C. K. Hope, J. Praten. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**, 324-330, (2005).
- [18] I.M. Bevilacqua, R.A. Nicolau, S. Khouri, A. Brugnera JR, G.R. Teodoro, R.A. Zângaro, M.T.T. Pacheco. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomedicine and Laser Surgery*, **25**, 513-518, (2007).
- [19] M. N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, **29**, 165-173, (2001).
- [20] A. Baptista. Efeito da terapia fotodinâmica na doença cárie estudo in vivo. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, (2009).
- [21] J.A. Williams, G.J. Pearson, M.J. Colles, M. Wilson. The effect the variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries research*, **37**, 190-193, (2003).
- [22] R.A. Prates. Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo in-vitro. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, (2005).
- [23] L.F.C. Oliveira. Espectroscopia molecular. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, **4**, 24-30, (2001).
- [24] G.S. Philippsen. Métodos fototérmicos aplicados ao estudo da penetração e da eficiência no processo de pigmentação de medicamentos para o tratamento do vitiligo. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2006).
- [25] E. Sehn. Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2006).

- [26] P.G. Hewitt, Física Conceitual, Editora Bookman, 9ª edição, (2002).
- [27] Kajkrause. Disponível em <http://kajkrause.blogspot.com/2009/06/o-espectro-eletromagnetico.html> acessado em 03/2011.
- [28] P.Jr. Alcantra. Espectroscopia Molecular. Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, (2002).
- [29] F. Pedrochi. Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2004).
- [30] A. Rosencwaig, A. Gersho. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, **47**, 64-69, (1976).
- [31] F.B.G. Astrath. Determinação de propriedades térmicas de materiais odontológicos utilizando a técnica fotoacústica com célula aberta. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2007).
- [32] A. Rosencwaig. Photoacoustic and Photoacoustic Spectroscopy. University of California, **57**, (1980).
- [33] L. Olenka. Caracterização do polietileno tereftalano tingido usando espectroscopia fotoacústica: monitoramento dos processos e propriedades térmicas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (1999).
- [34] G.A.R. Lima, M.L. Baesso, Z.P. Arguello, E. C. da Silva, and H. Vargas, L.C. Miranda. Phase-resolved photoacoustic spectroscopy: Application to metallic-ion-doped glasses. *Physical Review B*, **36**, 9812-9815, (1987).
- [35] D.T.D.F. Rosa. Caracterização óptica e térmica de materiais poliméricos via métodos fototérmicos. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, (2005).
- [36] A. Novatski. Preparação e caracterização do vidro aluminossilicato de cálcio dopado com TiO_2 . Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2006).
- [37] A.P. Cunha, A.P. Silva, O.R. Roque, E. Cunha. Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, **79**, 25-29, (2004).
- [38] L.C. Junqueira, J. Carneiro. Histologia Básica. Editora Guanabara Koogan S.A., 301-307, (1995).
- [39] I.R.L. Nogueira. Formação de par iônico como uma possível estratégia de aumento da permeação cutânea da paromomicina. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belo Horizonte, (2008).
- [40] F.S.G. Praça. Liberação e permeação in vitro, de produtos transdérmicos: um estudo metodológico e aparatos e condições experimentais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, (2010).

- [41] B.W. Barry. Novel mechanics and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **14**, 101-114, (2001).
- [42] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y. N. Kaila, R.H. Guy. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **52**, 103-112, (2001).
- [43] M. Egawa, H. Iwaki. In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen of by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy. *Skin Research and Technology*, **14**, 410-417, (2008).
- [44] D. Orentreich, A.S. Leone, G. Arpino, H. Burack. Chapter 28 Sunscreens: practical applications. *Comprehensive Series in Photosciences*, **3**, 535-559 (2001).
- [45] J. Flor, R. Davolos. Protetores solares. *Química Nova*, São Paulo, **30**, 153-158, (2007).
- [46] Veja na sala de aula. Disponível em http://veja.abril.com.br/saladeaula/150306/p_04.htm acessado em 03/2011.
- [47] Brasil Escola. Disponível em <http://www.brasilecola.com/curiosidades/origem-protetor-solar> acessado em 03/2011.
- [48] Aventuras na Escola. Disponível em <http://historia.abril.com.br/comportamento/protetor-solar> acessado em 03/2011.
- [49] Wikipédia. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Filtro_solar acessado em 03/2011.
- [50] R. Wolf, D. Wolf, P. Morganti, et al. Sunscreens. *Clinics in Dermatology*, **19**, 452-459, (2001).
- [51] Okuno, M.A.C. Velila. Radiação Ultravioleta: Características e Efeitos. Sociedade Brasileira de Física, Editora Livraria da Física, 1ª edição, **65**, (2005).
- [52] P. Perugini, S. Simeoni, S. Scalia, L. Genta, T. Modena, B. Conti, F. Pavanetto. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*, **246**, 37-45, (2002).
- [53] C. Antoniou, M.G. Kosmadaki, A.J. Stratigos, A.D. Katsambas. Sunscreens what's important to know, *Journal European Academy of Dermatology and Venereology*, **22**, 1110-1119, (2008).
- [54] B. Herzog, M. Wehrle, K. Quass. Photostability of UV Absorber Systems in sunscreens. *Journal Photochemistry and Photobiology*, **85**, 869-878, (2009).
- [55] J. E. French. NTP technical report on toxicity studies of 2-hydroxy-4 methoxybenzophenone. *Toxicity Report Series*, National Toxicology Program, **21**, 1-52, (1992).
- [56] V. Vanquerp, C. Rodriguez, C.Coiffard, L. J.M. Coiffard*,Y. De Roeck-Holtzhauer. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. *Journal of Chromatography A*, **832**, 273-277, (1999).
- [57] J.V. Stella, R.A. Rajewski. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical Research*, **14**, 556-567, (1997).

- [58] R.O. Williams, V. Mahaguna, M. Sriwongjanya. Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **46**, 355-360, (1998).
- [59] M. M. Del Valle. Cyclodextrins and their uses, a review. *Process Biochemistry*. Barking, **39**, 1033-1046, (2004).
- [60] V.A. Marcolino. Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2008).
- [61] Portal dos Fármacos. Disponível em <http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas-ciclodextrinas.html>. acessado em 04/2011.
- [62] J. Szejtli. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, **76**, 1825-1845, (2004).
- [63] A.I. Darling. The structure of the human tooth. University of Bristol Dental School, **18**, 70-75, (1959).
- [64] Metodologia Científica. Disponível em <http://metodologiacientificafouff.blogspot.com/> acessado em 04/2011
- [65] S.N. Bhaskar. Histologia e Embriologia Oral de Orban. Editora Artes Médicas, 10ª edição, 51-111, (1989).
- [66] R.Z. Legeros. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science, New York University College of Dentistry, New York, (1991).
- [67] I.A. Mjör, O. Fejerskov. Embriologia e Histologia Oral Humana. Editora Médica Panamericana, 50-129, (1990).
- [68] S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, **57**, 680-684, (2006).
- [69] M.C. E. Hashimoto. Redução bacteriana com diodo emissor de luz azul associado ao fotossensibilizador rodamina ácida B: estudo *in vitro* sobre *Streptococcus Mutans*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, (2005).
- [70] A. X. Graciano. Estudo da permeabilidade dentinária a diferentes fotossensibilizadores empregados na terapia fotodinâmica. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Maringá, (2011).
- [71] R.C. Silva. Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, (2007).
- [72] S.T.G. Buck. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para a aplicação em terapia fotodinâmica. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, (2009).

- [73] S.C. Núñez. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, (2007).
- [74] Y. Xu, M. J. Young, R. A. Battaglino, L. R. Morse, C. R. Fontana, T. C. Pagonis, R. Kent, N. S. Soukos. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *Basic Research Technology*, **35**, 1567-1572, (2009).
- [75] J.P. Tardivo, A.D. Giglio, C.S. Oliveira, D.S. Gabrielli, H.C. Junqueira, D.B. Tada, D. Severino, R.F. Turchiello, M.S. Baptista. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodynamics Therapy*, **2**, 175-191, (2005).
- [76] F. Harris, Z. Sayed, S. Hussain, D.A. Phoenix. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitisers to act as PDT agents. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1**, 231-39, (2004).
- [77] R. C. Souza, J. C. Junqueira, R. D. Rossoni, C. A. Pereira, E. Munin, A. O. C. Jorge. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*, **25**, 385-389, (2009).
- [78] P.S. Golding, T.A. King, L. Maddocks, D.B. Drucker, A.S. Blinkhorn. Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. *Journal Photochemistry and Photobiology*, **47**, 202-210, (1998).
- [79] F. Berbicz. Espectroscopia fotoacústica no estudo da caracterização do complexo de inclusão benzofenona-3-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina, na avaliação ex-vivo da penetração percutânea de formulação fotoprotetora. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, (2010).
- [80] E. Sehn, L. Hernandez, S.L. Franco, C.C.M. Gonçalves, M.L. Baesso. Dynamics reepithelialisation and penetration rate of bee formulation during cutaneous wounds healing. *Analytica Chimica Acta*, **635**, 115-120, (2009).
- [81] J. Hadgraft. Skin Deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**, 291-299, (2004).
- [82] F. Berbicz, A.C. Nogueira, A.M. Neto, M.R.M. Natali, M.L. Baesso, G. Matioli. Use of photoacoustic spectroscopy in the characterization of inclusion complexes of benzophenone-3-hydroxypropil- β -cyclodextrin and ex evaluation of the percutaneous penetration of sunscreen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2011).
- [83] R.M. Love, M.D. Mcmillan, H.F. Jenkinson. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infection and Immunity*, **65**, 5157-64, (1997).

-
- [84] M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.E. Biel. The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimmers in the photoinactivation of bacteria. *Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **71**, 87-98, (2003).
- [85] R.S. Manly, J.F. Bonner, H.C. Hodge. Light scattering in normal human dentine. The calculation of absorption and scattering constants. Department of Biochemistry and Pharmacology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, New York, 745-751, (1939).
- [86] J.J. ten Bosch and J.R. Zijp. Optical properties of dentin. Dentine and dentine reactions in the oral cavity, 34-40 (1987).

DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES



Universidade Estadual de Maringá

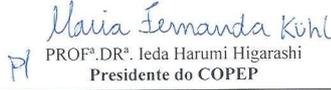
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

CAAE Nº.0355.0.093.000-09

PARECER Nº. 674/2009

Pesquisador (a) Responsável: RAQUEL SANO SUGA TERADA	
Centro/Departamento: CCS/Departamento de Odontologia	
Título do projeto: Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica associada ao tratamento restaurador atraumático sobre a cárie dentária.	
<p>Considerações:</p> <p>Trata-se de um projeto de pesquisa que tem como objetivo geral determinar a melhor aplicação clínica da terapia fotodinâmica sobre a cárie dentária. Este estudo será realizado em duas fases: primeiramente serão realizados testes <i>in vitro</i>, onde será definida a combinação de corante-fonte de luz mais eficiente na indução de morte bacteriana. Serão testados os corantes azul de metileno, azul de o-toluidina, clorofila e verde de malaquita, os quais serão irradiados com led vermelho ou laser. Na segunda fase, a melhor combinação corante-fonte de luz na indução de morte bacteriana <i>in vitro</i> será aplicada em 10 sujeitos jovens da Clínica Odontológica da UEM que apresentam cárie ativa, avaliando-se o número de colônias obtidas a partir do material cariado coletado antes e após tratamento fotodinâmico antimicrobiano.</p> <p>A documentação apresentada inclui cronograma de execução com início de coleta dos dados dos pacientes em abril de 2010 e encerramento do projeto em novembro de 2010; TCLE de acordo com a Res. 196/96 CNS; cronograma financeiro relativo a material de consumo a ser fornecido pelo Departamento de Química e pela Clínica Odontológica da UEM no valor de R\$1839,63; autorizações do coordenador da Clínica Odontológica da UEM, (Prof. Dr. Helio Hissashi Terada), do chefe adjunto do Departamento de Química (Prof. Dr. Eduardo Rodovanovic); e da chefia do Departamento de Farmácia e Farmacologia, (Profª. Dra. Graciette Matioli), os quais, <u>no entanto</u>, não mencionam especificamente, a sessão dos materiais de consumo arrolados no projeto no valor total de R\$1839,63.</p> <p>Sendo assim, somos de parecer favorável à aprovação do presente projeto com a recomendação de que seja especificada (explicitada) no corpo do projeto a autorização dos departamentos aos quais caberá o custeio (fornecimento) do material de consumo necessário para o desenvolvimento do projeto.</p>	
Situação: APROVADO	
CONEP: (X) para registro () para análise e parecer Data: 11/12/2009	
O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: Fevereiro de 2011	
<p>O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 187ª reunião do COPEP em 11/12/2009.</p>	<p><i>Maria Fernanda Köhl</i>  PROFª.DRª. Ieda Harumi Higarashi Presidente do COPEP</p>

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro do seu CAAE.
 Bloco 10 sala 01 – Avenida Colombo, 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá - PR
 Fone-Fax: (44) 3261-4444 – e-mail: copep@uem.br