UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina

reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores

Fabiana Graziola

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo 2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina

reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores

Fabiana Graziola

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. André Rolim Baby

São Paulo 2013 Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabaho, por qualquer meio convencional ou eletrônico , para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte (a autora).

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Г

G7850	Graziola, Fabiana Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores / Fabiana Graziola São Paulo, 2013. 81p.		
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador : Baby, André Rolim		
	1. Filtro solar : Cosméticos : Tecnologia 2. Proteção solar : Cosméticos 3. Flavonoide : Produtos naturais I. T. II. Baby, André Rolim, orientador.		
	668.55 CDD		

Fabiana Graziola

Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

> Prof. Dr. André Rolim Baby Orientador/Presidente

> > 1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, ____ de _____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aurides e José Luiz, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, *Renato*, pelo equilíbrio.

Ao Enrique, pela cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que esse trabalho fosse concluído e por disponibilizar pessoas que me acompanharam nessa jornada.

Ao meu orientador **Prof. Dr. André Rolim Baby**, pela oportunidade, generosa acolhida em seu grupo e atenção no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Luiz Antonio Gioielli** e ao **Prof. Humberto Gomes Ferraz,** pela utilização de seus laboratórios.

À **Prof^a Lorena Rigo Gaspar Cordeiro** e à **Prof^a Vânia Leite**, pelos preciosos comentários durante o processo de qualificação.

Aos *professores* que ministraram as disciplinas cursadas durante esse mestrado, pelo fomento de reflexões e adição de conhecimentos.

Aos técnicos *Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto*, *Edgard Muniz Machado Jr, Roberto de Jesus Honório e Liz Zanchetta,* pelo importantíssimo apoio com materiais, equipamentos e metodologias.

Aos colegas do laboratório de Cosmetologia *Camila Areias de Oliveira, Daniela D'Almeida Peres* e *Michele Dario*, pela convivência diária e o compartilhar muito próximo das descobertas, tristezas e alegrias durante o período deste mestrado.

Aos colegas de outros laboratórios, *Flávia Sobrera, Miriam Sakuragui Matuo, Harry Leo Wysocki Jr., José Eduardo Gonçalves, Mark Strasser, Peky Noriega,* pelo constante apoio.

À *Michele Georges Issa, Roberta Claro* e *Fabiana Soares*, pela generosidade em compartilhar tempo e conhecimento importantes para o entendimento de técnicas e resultados obtidos neste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica, *Franciele Cristina Martins*, *Danielle Maeda* e *Viviane Kaori Tokunaga*, pelo empenho e trabalho indispensável na realização de alguns dos ensaios deste trabalho.

Aos amigos, prof[°] Rui Curi, Valdomero Melo, Anita Nishiyma, M^a Conceição Condesso, Cleinton Souza, Denilton Costa, Evelyn Ojoe, Patrícia Calvente, Giovanna Borini, Alessandra Fagiolli, Karina Adati, Marcello Rezende, Joelmir Silva, Simone Camillo, Patrícia Nancy Iser Bem, José Henrique Gonçales, Ana Claudia Vallin, Elaine Monteiro, Regina Hassegawa, pelo constante incentivo.

À Dhaymers Ind.Com.Prod.Químicos Ltda. e à Croda do Brasil Ltda., pelo fornecimento de materiais.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por disponibilizar estrutura, equipamentos e profissionais capacitados para execução deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão dos recursos necessários.

A todos os demais que cooperaram para a viabilização e realização deste trabalho que é um marco importante de meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito obrigada !

RESUMO

GRAZIOLA, F. Obtenção e caracterização de microesferas de gelatina reticuladas com flavonoide para aplicação em fotoprotetores. 2013. 81 f.
Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O glutaraldeído tem sido amplamente utilizado para reticulação guímica da gelatina, no entanto, substâncias de origem natural têm sido propostas como agentes reticulantes de melhor biocompatibilidade. Uma alternativa viável são os polifenois tais como os flavonois que também apresentam o potencial de sinergia com filtros solares e agentes antioxidantes utilizados em formulações cosméticas. No presente trabalho, microesferas de gelatina obtidas por polimerização em emulsão utilizando tensoativo e extração com solvente foram reticuladas com 10 mM de glutaraldeído (GTA) ou com 10 mM rutina (RUT) dissolvidos em acetona:NaOH 0,01 M. As características físico-químicas foram avaliadas por meio de: microscopia eletrônica de varredura, determinação do potencial de intumescimento por microscopia óptica comum, determinação de grupos aminos livres por reação com ácido 2,4,6trinitrobenzenossulfônico, determinação de área superficial e porosidade por adsorção gasosa, determinação de densidade verdadeira por picnometria de gás hélio, distribuição granulometria por difração a laser, termogravimetria e análise térmica diferencial. Devido a interferentes, não foi possível mensurar a extensão de reticulação das microesferas reticuladas com RUT, porém os demais resultados obtidos sugerem que ocorreu reticulação mas em menor extensão que o GTA. A aplicabilidade em fotoproteção foi avaliada in vitro por espectrofotometria de refletância difusa em dispersões oleosas contendo benzofenona-3 e/ou octilmetoxicinamato. Os resultados observados indicaram que na concentração de 5% p/p as microesferas não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT não apresentam eficácia fotoprotetora ou efeito sinérgico com os filtros químicos estudados.

Palavras-chave: Microesferas de gelatina. Rutina. Fotoproteção.

ABSTRACT

GRAZIOLA, F. Preparation and characterization of gelatin microspheres crosslinked with flavonoid for sunscreening application. 2013. 81 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Glutaraldehyde has been widely used as gelatin chemical cross-linking agent. However new natural cross-linking agents has been proposed as a more biocompatible source. Polyphenols are feasible candidates and the flavonols also exhibit potential synergism with sunscreens and antioxidant agents used in cosmetics formulations. In this study, gelatin microspheres obtained by polymerization in waterin-oil emulsion technique with tensoative and extraction with solvent were crosslinked with glutaraldehyde 10 mM (GTA) or with rutin 10 mM (RUT) solved in acetone:NaOH 0,01M. The physicochemical properties were evaluated by: scanning electron microscopy, swelling potential by optical microscopy, degree of cross-linking by 2,4,6-trinitro-benzensulfonic acid, surface area and porosity by gas adsorption, true density by hellium pycnometry, granulometry by laser light diffraction, thermogravimetry and differential scanning calorimetry. Due to interferents, was not possible to measure degree of cross-linking of gelatin microspheres crosslinked with RUT, however other findings suggest that crosslinking has occurred but in a lower degree than GTA crosslinking. Applicability in sun protection was evaluated in vitro by diffuse transmitance measurements in oily dispersion with benzophenone-3 and/or octyl methoxycinnamate. These results showed that at 5% w/w gelatin microspheres crosslinked with GTA or RUT did not exhibit sun protection efficacy or synergism with UV chemical filters that were evaluated.

Keywords: Gelatin microspheres. Rutin. Sun protection.

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Processos de obtenção de gelatina ácida e alcalina a partir do colágeno5
Figura 2: Representação esquemática dos sistemas microparticulados9
Figura 3: Representação da reação de reticulação inter e intracadeias de um polímero10
Figura 4: Reações de formação de base de Schiff (1) e adição de Michael (2) do GTA com proteínas
Figura 5: Representação das reações do ácido fenólico com as cadeias laterais de polipeptídeos
Figura 6: Representação esquemática do núcleo comum fundamental dos flavonoides (estrutura química geral)15
Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das microesferas de gelatina pelo método de polimerização em emulsão, utilizando tensoativo e extração com solvente
Figura 8 : Fluxograma do processo de reticulação das micropartículas de gelatina .27
Figura 9 : Amostras fixadas em suporte metálico e metalizadas em filme fino de platina para obtenção de micrografias em MEV
Figura 10 : Fotografia mostrando aspecto de: (a) gelatina utilizada para obtenção das microesferas; (b) microesferas de gelatina não reticuladas; (c) microesferas de gelatina reticuladas com GTA; (d) microesferas de gelatina reticuladas com RUT36
Figura 11 : Aglomerado de gelatina obtido por adição rápida de acetona
Figura 12 : Filme de gelatina obtido por reticulação das microesferas de gelatina com RUT em meio aquoso e alcalino

Figura 13 : Fotomicrografia por MEV da gelatina, na qualidade de matéria-prima, em Figura 14 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina não reticuladas em aumentos de (a) 3.000 vezes, (b) 25.000 vezes e (c) 50.000 vezes40 Figura 15 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina reticuladas com GTA em aumentos de (a) 3.000 vezes, (b) 25.000 vezes e (c) 50.000 vezes......41 Figura 16 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina reticuladas com Figura 17 : Fotomicrografia por MEV de: (a) microesferas de gelatina não reticuladas; (b),(c) microesferas de gelatina reticuladas com GTA. Aumentos de: (a) Figura 18 : Fotomicrografia por MEV de microesferas de gelatina reticuladas com Figura 19: Fotomicrografia de hidrogel de gelatina obtida por microscopia óptica comum em aumento de 400 vezes após 1 dia em temperatura ambiente (entre 20,0°C e 25,0 °C)......46 Figura 20: Fotomicrografias de microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas, em meio aquoso em diferentes períodos de tempo obtidas por microscopia óptica comum em aumento de 400 vezes......47 Figura 21 : Reação do TNBS com os grupos amino de proteínas para formar Figura 22 : Curva padrão de L-leucina50

Figura 24: Distribuição de tamanho de partículas por meio de dispersão líquida em
equipamento de difração de raios laser. (a): gelatina; (b): microesferas de gelatina
não reticuladas; (c): microesferas de gelatina reticuladas com GTA; (d) microesferas
de gelatina reticuladas com RUT56
Figura 25: Análise calorimétrica. (a): Curvas de TG; (b): Curvas de DSC59
Figura 26: Dispersões utilizadas para avaliação de aplicabilidade
Figura 27: Fotografia mostrando aspecto de BZ363
Figura 28: Perfil espectral das dispersões sem filtro solar e com Gel, M0, MG ou MR (dispersões A,B,C,D,E)
Figura 29: Perfil espectral das dispersões contendo BZ3 isolada ou combinada com
Gel, M0, MG ou MR (dispersões F,G,H,I,J)67
Figura 30: Perfil espectral das dispersões contendo OCT isolado ou combinado com
Gel, M0, MG ou MR (dispersões K,L,M,N,O)
Figura 31: Perfil espectral das dispersões contendo BZ3 e OCT isolados ou
combinados com Gel, M0, MG ou MR (dispersões P,Q,R,S,T)69

RELAÇÃO DE EQUAÇÕES

Equação 1 : Extensão de reticulação das microesferas de gelatina	30
Faussão 2 : Fotor do protocão color ostimodo	24
	34

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 4: Resultados de absorbância a 345 nm e equação da reta para curva de Lleucina. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3)......50

 Tabela 8 : Perda de massa em duas faixas de temperatura e massa residual obtidas por TG de gelatina e microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).....60

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1: Equipamentos empregados para a realização do presente trabalho	20
Quadro 2: Materiais diversos utilizados para a realização do presente trabalho	21
Quadro 3: Matérias-primas e reagentes empregados para obtenção, reticulação e análise das microesferas de gelatina	22
Quadro 4 : Matérias-primas empregadas na preparação das dispersões para a avaliação de atividade fotoprotetora <i>in vitro</i>	23

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
A/O	Emulsão do tipo água em óleo
AOAC	American Organization of Analytical Chemists
BET	Brunauer, Emmet e Teller
BSE	Bovine spongiform encephalopathy
BZ3	Benzofenona-3
С	Carbono
Ca (OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CAS	Chemical Abstracts Society
cm	Centímetro
D	Dalton
DCP	Designação de categoria de proteção
DSC	Differential scanning calorimetry
FPS	Fator de proteção solar
FDA	Food and drugs administration
g	Grama
GMIA	Gelatin Manufacturers Institute of America
GME	Gelatin Manufacturers of Europe
GTA	Glutaraldeído
h	Hora(s)
HCI	Ácido clorídrico
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredient
Ltda.	Limitada
M0	Microesferasde gelatina não reticuladas
Mercosul	Mercado comum do Sul
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
MG	Microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MR	Microesferas de gelatina reticuladas com rutina
n	Número de elementos
Ν	Normal
nm	Nanômetro
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O/A	Emulsão do tipo óleo em água
OCT	Octilmetoxicinamato
P.A.	Para análise, grau analítico
p/p	Porcentagem peso/peso
p/v	Porcentagem peso/volume
рН	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico
рКа	Log de Ka (constante de dissociação de um ácido)
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
RUT	Rutina
TG	Termogravimetria
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNP	Derivado trinitrofenólico
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v/v	Porcentagem volume/volume

1.	Introdução				
2.	Re	evisã	o da literatura	3	
	2.1	Ge	latina	3	
	2.1	1.1	Hidrogéis	7	
	2.2	Sis	temas particulados	8	
	2.3	Re	ações de reticulação da gelatina com glutaraldeído	9	
	2.4	Re	ações de reticulação da gelatina com polifenois	12	
	2.5	Fla	vonoides	14	
	2.6	Pro	oteção solar	16	
3.	Ob	ojetiv	'OS	19	
4.	Ma	ateria	al e Métodos	20	
	4.1	Ма	terial	20	
	4.1	1.1	Equipamentos	20	
	4.1	1.2	Materiais diversos	21	
	4.1	1.3	Matérias-primas e reagentes	22	
	4.2	Mé	todos	24	
	4.2	<u>2</u> .1	Obtenção das microesferas de gelatina	24	
	4.2	2.2	Reticulação das microesferas de gelatina	26	
	4.2	2.3	Aspecto por microscopia eletrônica de varredura	27	
	4.2	2.4	Determinação do percentual de intumescimento com avaliação visual		
	ро	r mio	croscopia óptica comum	28	
	4.2	2.5	Determinação da extensão da reticulação	29	
	4.2	2.6	Determinação da área superficial	30	
	4.2	<u>2</u> .7	Determinação da densidade verdadeira	31	
	4.2	2.8	Determinação da distribuição granulométrica	31	
	4.2	2.9	Análise calorimétrica	31	

	4.2	.10	Preparo de dispersões	32
	4.2.11		Atividade fotoprotetora in vitro: FPS e proteção frente à radiação UVA.	34
	4.2	.12	Análise de resultados	35
5.	Re	sultade	os e Discussão	36
5	.1	Obter	nção das microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas	36
5	.2	Aspe	cto por MEV	39
5	5.3 Intur 5.4 Exte		escimento	46
5			são de Reticulação	48
5	.5	Área	Superficial, volume e tamanho de poro e densidade verdadeira	54
5	.6	Distril	ouição granulométrica e diâmetros das partículas	56
5	.7	Anális	se calorimétrica	58
5	.8	Dispe	ersões utilizadas para avaliação de aplicabilidade	61
5	.9	Ativid	ade fotoprotetora in vitro: FPS e proteção frente à radiação UVA	63
6.	Со	nsider	ações Finais	71
7.	Со	nclusõ	es	72
8.	Re	ferênc	ias	73

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Microesferas são micropartículas nas quais uma substância de interesse encontra-se homogeneamente dispersa no interior de uma matriz polimérica ou cerosa, formando um sistema monolítico no qual não é possível identificar um núcleo diferenciado (BRESOLIN *et al.*, 2003).

A gelatina é um polímero natural biodegradável que pode ser utilizado para produzir micropartículas. Porém, devido à solubilidade em meio aquoso e limitadas propriedades mecânicas e térmicas, as micropartículas de gelatina necessitam de melhorias para que possam ser utilizadas em aplicações de longa duração (BIGI *et al.*, 2002; ESPOSITO *et al.*, 1995; HAYASHI; TABATA, 2011; NIMNI *et al.*, 1988).

Reações de *crosslink*, em língua portuguesa "reações de reticulação" ou de "entrecruzamento", podem ser realizadas por meios químicos ou físicos e causam modificações estruturais que melhoram a resistência mecânica e a resistência à água da gelatina (GONSALVES *et al.*, 2011; RATANAVARAPORN *et al.*, 2010).

O glutaraldeído (GTA) é o aldeído mais utilizado como reticulante químico, porém preocupações com toxicidade e falhas em materiais reticulados com GTA, tais como válvulas cardíacas, impulsionaram a busca por novas substâncias reticulantes (BIGI *et al.*, 2002; CATALINA *et al.*, 2010; PENG; LI; SHEN, 2012; ZHAI *et al.* 2010).

Substâncias obtidas de fontes naturais, tais como as pertencentes ao grupo dos flavonoides, têm sido estudadas como nova alternativa de agente reticulante químico para a gelatina (BIGI *et al.*, 2002; KOSARAJU; PUVANETHIRAN; LILLFORD, 2010; STRAUSS; GIBSON, 2004).

Os flavonoides são estruturas polifenólicas formadas por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a um anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C_6 - C_3 - C_6 . Devido a tal estrutura, no Reino Vegetal, os flavonoides se caracterizam como agentes intrínsecos de proteção frente à radiação solar do tipo ultravioleta (UV) por atuarem como filtros químicos que absorvem nesse intervalo de comprimento de onda (BRUNETON, 1991; HARBONE; WILLIANS, 2000).

Os filtros químicos são substâncias que podem ser incluídas em formulações cosméticas a fim de proteger a pele dos danos causados pela radiação solar. Porém, eles podem gerar radicais livres quando em contato com a radiação solar e

apresentam problemas relacionados à fotoalergenicidade e irritação cutânea (FLOR; DAVOLOS; CORREIA, 2007; HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006).

Tal cenário tem impulsionado a busca de alternativas para minimizar ou eliminar esses efeitos e existe a tendência do desenvolvimento de formulações cosméticas fotoprotetoras com concentração reduzida de filtros químicos, mas com proteção elevada frente às radiações UVA e UVB. As pesquisas de novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares ainda são extensivamente realizadas e atualmente se destaca um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros solares baseados em produtos naturais (GUARATINI *et al.*, 2009; SCHLUMPF *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foi estudada a utilização do flavonoide rutina, como alternativa ao GTA para a reticulação de micropartículas de gelatina. Foram determinadas as propriedades físico-químicas e funcionais das micropartículas com objetivo de avaliar sua aplicação como agente sinérgico de melhoria no desempenho de formulações cosméticas fotoprotetoras.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da literatura

2.1 Gelatina

A gelatina é um polímero natural, de alto peso molecular, biodegradável, hidrofílico, solúvel em água, obtido a partir do colágeno de tecidos animais. A grande maioria das gelatinas comerciais é obtida a partir de pele e ossos de espécies mamíferas principalmente de bovinos e suínos. Porém, nos últimos anos, existe um número crescente de estudos que, impulsionados por questões como restrições religiosas e a crise da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) que ocorreu no início dos anos 2000, têm dedicado atenção à gelatina derivada de pele, ossos, barbatanas, escamas e bexiga natatória de diferentes espécies de peixe (GILSENAN; ROSS-MURPHY, 2001; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2002, 2009, 2011).

Na área terapêutica e farmacêutica, a gelatina tem sido utilizada em aplicações como a obtenção de cápsulas flexíveis e rígidas, como selante para próteses vasculares, curativos, compressas para uso cirúrgico e em sistemas particulados para liberação modificada de fármacos. Na área cosmética, a gelatina e, também, a sua forma hidrolisada, encontram ampla aplicação em produtos para pele e cabelo. Nos produtos para limpeza da pele, ela é usada para reduzir o efeito alergênico dos surfactantes aniônicos. Nas preparações para uso capilar, devido à afinidade com a queratina capilar, a forma hidrolisada é usada para proteger a estrutura do cabelo minimizando o dano nos produtos para cacheamento permanente, descoloração ou coloração (BABEL *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 1995; NIMNI *et al.*, 1988).

A obtenção da gelatina se dá pela desnaturação térmica ou pela hidrólise parcial do colágeno, a proteína fibrosa que é o principal constituinte dos ossos, cartilagens, tendões e pele (JOHNSTON-BANKS, 1990; VEIS,1964).

Existem mais de 20 polimorfos do colágeno que são classificados em 3 tipos principais (I,II e III) e um tipo que reúne todos os outros tipos de colágeno. Os tipos I a III são os mais abundantes. O tipo I ocorre nos ossos e na pele e é o mais importante para a obtenção de gelatina, o tipo II ocorre quase que exclusivamente no tecido cartilaginoso e o tipo III ocorre na pele. Os demais tipos de colágeno ocorrem em baixas concentrações e desempenham funções específicas em outros órgãos. Todos os tipos de colágeno apresentam estrutura de tripla hélice, porém, o

comprimento, o tipo e a posição das regiões não-helicoidais são variáveis. A tripla hélice dos colágenos tipos I a III, que são solúveis em água, sofre modificações extracelulares por meio de reticulação e formação de fibrilas resultando em elevado grau de associação e insolubilidade em água. Esta modificação aumenta sensivelmente a estabilidade térmica, mecânica e enzimática do colágeno e sua extensão é dependente da idade. Consequentemente, os parâmetros e as condições de extração da gelatina devem ser adaptados em função da idade do material de origem (BABEL *et al.*, 2012; KARIM; BHAT, 2009).

O colágeno nativo insolúvel deve ser pré-tratado antes de ser convertido em uma forma adequada para extração de gelatina, o que geralmente é feito por aquecimento em água em temperaturas superiores a 45 °C. Um pré-tratamento químico romperá as ligações não-covalentes, desorganizando a estrutura proteica, produzindo o intumescimento adequado e a solubilização do colágeno (STAINSBY, 1987). O subsequente tratamento com calor cliva o hidrogênio e as ligações covalentes para desestabilizar a tripla hélice, resultando em uma transição hélice-espiral e a conversão em gelatina solúvel (DJABOUROV; LECHAIRE; GAILL, 1993; GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2002). O grau de conversão do colágeno em gelatina está relacionado ao rigor do pré-tratamento e ao processo de extração com água morna. Parâmetros como o valor de pH do meio, a temperatura e o tempo de extração, também influenciam (JOHNSTON-BANKS,1990). Nas gelatinas obtidas a partir de peles de peixes, devido à instabilidade da reticulação do colágeno imaturo, um tratamento ácido ameno é suficiente para solubilizar o colágeno (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

A gelatina é anfotérica: em soluções ácidas possui carga positiva e em campo elétrico migra como cátion; em soluções alcalinas possui carga negativa e em campo elétrico migra como ânion. O ponto intermediário, no qual a carga é nula e não ocorre migração, é denominado de ponto isoiônico ou ponto isoelétrico. A gelatina Tipo A, produzida por meio de hidrólise ácida do colágeno, possui ponto isoelétrico entre pH 6,0 e 9,5. A gelatina Tipo B, produzida por meio de hidrólise alcalina do colágeno, possui ponto isoelétrico entre pH 4,7 e 5,6. A diferença nos pontos isoelétricos das gelatinas tipos A e B é resultado da desaminação parcial da glutamina e asparagina para os correspondentes ácidos glutâmico e ácido aspártico. A mistura dos tipos A e B, assim como gelatinas produzidas por modificações nos

processos mencionados, podem resultar em pontos isoelétricos fora desses parâmetros (BABEL *et al.*, 2012).

Os processos de obtenção da gelatina ácida e alcalina a partir do colágeno são apresentados na **Figura 1**.



Figura 1: Processos de obtenção de gelatina ácida e alcalina a partir do colágeno

Legenda: $Ca(OH)_2$: hidróxido de cálcio; h: horas; PI: ponto isoelétrico **Fonte:** Modificado de Tabata e Ikada (1998)

A gelatina tem como característica inerente o elevado conteúdo dos aminoácidos glicina, prolina (principalmente, como hidroxiprolina) e alanina que ocorrem em sequências repetidas originando estrutura de tripla hélice. As gelatinas comerciais são misturas de cadeias polipeptídicas do tipo α (uma cadeia), β (duas cadeias α reticuladas covalentemente) e γ (três cadeias α reticuladas covalentemente). Possuem ampla variação de pesos moleculares, desde poucas centenas até milhares de centenas, atingindo a milhões de daltons (COESTER *et al.,* 2000; KARIM; BHAT, 2009; VEIS, 1964; ZWIOREK *et al.*, 2004).

Dependendo do grau de hidrólise do colágeno, são obtidas a gelatina do tipo geleificante [CAS *number* 9000-70-8] ou o hidrolisado de gelatina do tipo não-geleificante, também denominado de hidrolisado de colágeno [CAS *number* 68410-45-7].

Quando os grânulos da gelatina do tipo geleificante são imersos em água fria, eles se hidratam e se convertem em partículas discretamente intumescidas que se dissolvem a aproximadamente 40,0 °C e formam géis quando são resfriados. A gelatina do tipo não-geleificante é solúvel em água fria e a variação de sua massa molecular encontra-se em uma faixa na qual a geleificação não é observada (< 15000 D). Ambos os tipos de gelatina são insolúveis em solventes de baixa polaridade tais como o benzeno, éter de petróleo, etanol, acetona e tetraclorometano (BABEL *et al.*, 2012; ROSS-MURPHY, 1992).

Entre as características funcionais da gelatina está a força, ou poder geleificante, do gel formado que pode ser mensurada sob condições padrão. O gelômetro de Bloom foi desenvolvido e patenteado por O. T. Bloom em 1925 para medir a rigidez do gel de gelatina por meio da determinação do peso (força em gramas) necessário para causar uma depressão na superfície de um gel de gelatina de 4,0 mm usando uma sonda cilíndrica de com 12,7 mm de diâmetro e superfície plana. O método de Bloom foi padronizado pela American Organization of Analytical Chemists (AOAC), Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) e Gelatin Manufacturers of Europe (GME). De acordo com a GMIA o teste de Bloom deve ser realizado utilizando-se: solução de gelatina a 6,67% (p/p); intumescimento completo (1±3 horas a temperatura ambiente); dissolução da gelatina a 65,0 °C por 15 minutos, 61,0 °C até a dissolução completa; equilíbrio a 45,0 °C por 30±45 minutos ou a temperatura ambiente por 15±20 minutos e maturação em banho de água a 10,0 ± 0,1°C por 16±18 horas. Por definição, a força do Bloom representa somente o gel de gelatina maturado a 10,0 °C e o valor do Bloom não pode ser determinado se a solução de gelatina não geleificar a 10,0 °C após 16±18 horas. Atualmente, os valores de Bloom são geralmente determinados pelo uso de texturômetros. A sonda usada no teste deve ser conforme o padrão da AOAC que apesar de ter as mesmas dimensões da antiga sonda da BSI (que não é utilizada desde 1998), possui bordas em ângulo agudo que aumentam a superfície fornecendo valores de Bloom um pouco maiores. Os parâmetros do teste em equipamentos também são descritos nos métodos padrão mencionados anteriormente e devem ser rigorosamente seguidos.

Os valores de Bloom das gelatinas comerciais variam de 50 a 300 g Bloom, sendo que o valor mais alto representa gelatina com maior poder geleificante e temperatura de fusão e gel mais forte. As gelatinas são classificadas como: Bloom alto, 200-300 g; Bloom médio, 100-200 g e Bloom baixo, 50-100 g (HAUG; DRAGET, 2009).

2.1.1 Hidrogéis

Devido à propriedade de geleificação, a gelatina é uma alternativa bastante atrativa para o preparo de hidrogéis que são materiais capazes de absorver e reter grandes volumes de água em sua estrutura tridimensional intumescida sem sofrerem dissolução (CAI; GUPTA, 2005).

Os hidrogéis são considerados biocompatíveis com várias aplicações como lentes de contato, tendões artificiais, matrizes para engenharia de tecidos e sistemas de liberação de fármacos. O uso de gelatina para o preparo de hidrogéis apresenta vantagens tais como ser um polímero de origem natural que não apresenta antigenicidade, ser completamente reabsorvida *in vivo* e ter propriedades físico-químicas que podem ser adequadamente moduladas. Devido ao grande número de grupos funcionais nas cadeias laterais, a gelatina pode ser submetida à reticulação química e a extensão de reticulação pode ser modulada de maneira a obter hidrogéis que possuam propriedades físicas, químicas e biológicas para atender a necessidades mecânicas e funcionais específicas. Por exemplo, a capacidade de absorção de água é determinada pela presença de grupos hidrofílicos e pelo grau de reticulação podendo variar de 20,0 % a 95,0 % do peso total (BULCKE *et al.*, 2000; CAI; GUPTA, 2005; XIAO *et al.*, 2011).

O tamanho do *mesh* de um hidrogel refere-se à distância entre pontos de reticulação e geralmente é medido em ângstrons (Å), com valores que algumas vezes variam de 10,0 a 150,0 Å. Esse parâmetro relaciona-se com as propriedades mecânicas do hidrogel tais como rigidez e taxa de difusão das substâncias incorporadas, que também depende do tamanho da substância incorporada (BRYANT; ANSETH, 2002; LIN; ANSETH, 2009).

A taxa de intumescimento de um hidrogel fornece uma ideia da captação de água e fluidos e é um fator que pode contribuir para definir a extensão de sua degradação. A molécula de água, que tem cerca de 2,0 Å, se difunde facilmente

através de um hidrogel o que aumenta a hidrólise e contribui para a erosão da estrutura do hidrogel (AURAND; LAMPE; BJUGSTAD, 2012).

A previsão de liberação de fármacos e biomoléculas inseridos em hidrogéis pode ser feita por meio de modelos matemáticos como o desenvolvido por Cheng e colaboradores (2011) para estudar o efeito da reticulação e da degradação enzimática da matriz de um hidrogel.

Os hidrogéis podem ser flexíveis como os tecidos moles, rígidos como cartilagens ou elásticos e mimetizar a pele ou os vasos sanguíneos e serem construídos com tamanhos e formatos diversos entre os quais podem ser citados os sistemas particulados (AURAND; LAMPE; BJUGSTAD, 2012).

2.2 Sistemas particulados

Micropartícula é o termo usado para partículas esféricas com diâmetros na faixa micrométrica (tipicamente de 1-1000 µm). As micropartículas poliméricas são formadas por uma matriz polimérica na qual uma pequena quantidade de substância pode ser imobilizada. Quando as micropartículas apresentam um núcleo delimitado onde a substância de interesse pode ser incluída, são denominadas de "microcápsulas". Quando a substância de interesse encontra-se homogeneamente dispersa no interior da uma matriz, formando um sistema monolítico no qual não é possível identificar um núcleo diferenciado são denominadas de "microesferas". O material polimérico forma uma rede tridimensional, onde a substância de interesse pode ser adsorvida, incorporada ou ligada covalentemente à superfície, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos As micro/nanocápsulas são partículas normalmente esféricas, se estiverem carregando um líguido ou gás, ou de outro formato quando carregarem partículas sólidas ou semissólidas, já que constituem um sistema do tipo reservatório. O material micro/nanoencapsulado é chamado de núcleo ou fase interna, enquanto a fase externa é conhecida como parede, revestimento ou membrana (BRESOLIN et al., 2003; CAMPOS et al., 2013).

A Figura 2 representa os sistemas microparticulados.



Figura 2: Representação esquemática dos sistemas microparticulados

Diferentes técnicas têm sido propostas para a produção de micropartículas entre as quais podem ser citadas: geleificação, emulsionamento, extrusão, *spray drying* e leito fluidizado. A combinação de dois métodos também é frequentemente utilizada (BRUN-GRAEPPI *et al.*, 2011).

A técnica de emulsionamento para produção de micropartículas é frequentemente acompanhada por uma etapa de geleificação. Inicialmente, uma solução aquosa do polímero é dispersa em uma fase orgânica imiscível, como o óleo, fazendo o uso de tensoativos. Quando a dispersão atinge o equilíbrio, a formação do gel é iniciada pelo resfriamento ou pela adição de agente geleificante à emulsão. A técnica de emulsionamento é vantajosa do ponto de vista de escalonamento industrial, porém, as partículas formadas possuem ampla distribuição de tamanho que pode variar de micrômetros a milímetros e ,quando tamanhos menores são necessários devem ser utilizadas outras técnicas, tal como a tecnologia de microfluidos (RABANEL *et al.*, 2009).

2.3 Reações de reticulação da gelatina com glutaraldeído

A estrutura primária da gelatina oferece possibilidades diversas para modificações químicas e para a ligação covalente de substâncias, tanto na parte interna da matriz ou somente na região de superfície. No primeiro caso, devem ser realizadas modificações químicas nas macromoléculas antes que as partículas estejam formadas enquanto que, no último caso, a superfície das partículas é utilizada (WEBER *et al.*, 2000).

Entre aos métodos de modificação da gelatina estão a reticulação, que leva ao aumento da viscosidade de soluções de gelatina e do ponto de fusão dos géis de

Legenda: a) microcápsula contendo fármaco dissolvido no núcleo; b) microcápsula contendo fármaco adsorvido à parede polimérica; c) microesfera contendo fármaco retido na matriz polimérica; d) microesfera contendo fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica **Fonte:** Schaffazick *et al.* (2003)

gelatina e também afeta as propriedades físico-químicas e mecânicas das gelatinas sólidas (KOZLOV; BURDYGINA, 1983).

Os mecanismos de reticulação podem ser classificados em intra-hélice e inter-hélice. A distância entre as moléculas de gelatina determinará se as ligações serão do tipo intra ou intermolecular. O primeiro tipo inclui as ligações formadas entre duas cadeias polipeptídicas nas mesmas hélices e influencia a temperatura de desnaturação. Estas reações de reticulação podem estabilizar as regiões de tripla hélice da gelatina, mas não aumentar a força mecânica. O segundo tipo, as ligações inter-hélice, é formado entre cadeias peptídicas de duas hélices adjacentes, aumentando o peso molecular da gelatina e afetando propriedades como o intumescimento e a flexibilidade (CATALINA *et al.*,2010).

Um esquema das reações de reticulação entre as cadeias de um polímero é apresentado pela Figura 3.



Figura 3: Representação da reação de reticulação inter e intracadeias de um polímero

Legenda: a) cadeias não reticuladas; b) cadeias reticuladas (intra e inter cadeias) Fonte: Modificado de Gilleo (1996)

Métodos físicos e químicos podem ser usados para realizar a reticulação de hidrogéis de gelatina. Entre os métodos físicos estão o tratamento deidrotérmico, foto-oxidação, orientação segmental, radiação ultravioleta e gama, entre outros. A reticulação física ocorre por meio de ligações não-covalentes tais como interação de van der Waals, interações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas e os hidrogéis fisicamente reticulados podem sofrer modificações de formato. Entre os agentes químicos encontram-se os aldeídos, carbodiimidas, compostos epóxi, acil

azidas e compostos fenólicos. A reticulação química ocorre por meio de ligações covalentes e os hidrogéis quimicamente reticulados não se dissolvem em água sob qualquer condição (BIGI *et al.*, 2001, 2002; CAI; GUPTA,2005)

Atualmente, o agente reticulante mais amplamente utilizado é o glutaraldeído (GTA). Ele é um dialdeído linear, líquido, de odor pungente, incolor a levemente colorido, solúvel em água e solventes orgânicos. Tem baixo custo e é facilmente encontrado em soluções aquosas ácidas com concentrações de menos de 2,0 % até 70,0% (p/v) (BIGI *et al.*, 2002; MIGNEAULT *et al.* 2004).

As soluções aquosas de GTA são constituídas por uma mistura de aldeídos livres, GTA monomérico mono e di-hidratado, hemicetais e vários polímeros α , β -insaturados. Existe uma amplo debate para determinar qual dessas estruturas, que são pH dependentes, é a mais reativa com proteínas (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996; MIGNEAULT *et al.* 2004).

O GTA pode reagir com vários grupos funcionais das proteínas, tais como amina, tiol, fenol e imidazol devido às cadeias laterais mais reativas serem nucleofílicas (HABEEB; HIRAMOTO, 1968).

A formação de bases de Schiff devido ao ataque nucleofílico de grupos amino terminais de resíduos de lisina na estrutura protéica e a adição de grupos amino às duplas ligações etilênicas dos oligômeros α , β -insaturados encontrados nas soluções aquosas de GTA (adição de Michael) são mecanismos propostos para explicar tais reações conforme apresentado na **Figura 4** (MIGNEAULT *et al.* 2004).



Figura 4: Reações de formação de base de Schiff (1) e adição de Michael (2) do GTA com proteínas

Fonte: Migneault et al.(2004)

Segundo Bigi e colaboradores (2001), a concentração de 0,05% (p/v) de GTA é suficiente para reticular de cerca de 60,0 % dos grupamentos ε -amino e, variandose a concentração deste, são obtidos filmes de gelatina com propriedades físicoquímicas distintas.

Devido à capacidade de reticular as proteínas celulares, o GTA possui atividade biocida e é utilizado como antimicrobiano de uso geral. Ele é aprovado como aditivo indireto para usos diversos em produtos alimentícios e afins e, na área médica, é usado para esterilização a frio de instrumentação cirúrgica e endoscópios, processamento de filmes de raios-X e como fixador de tecidos biológicos (ZEIGER *et al.*, 2005).

O GTA pode ser utilizado como agente conservante para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. No Brasil, a máxima concentração autorizada é de 0,1%, sendo proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e sprays) e, quando utilizado no produto acabado em concentrações superiores a 0,05%, deve ser citado nas condições de uso e advertência (BRASIL, 2012a).

A exposição do consumidor ao GTA é mínima e as vias típicas de exposição são pele, olhos e trato respiratório. Ele pode causar irritação se for inalado ou se entrar em contato com a pele e também causar a sensibilização cutânea. Poderá causar toxicidade fisiológica e também calcificar implantes de longa duração se for liberado no organismo durante o processo de biodegradação (BIGI *et al.*, 2002; CATALINA *et al.*, 2010; PENG; LI; SHEN, 2012).

Contudo, os estudos sobre a toxicidade do GTA apresentam resultados conflitantes. Geralmente, os relatos de efeitos adversos ocorrem com concentrações elevadas de GTA. Já foram demonstrados efeitos citotóxicos em concentrações inferiores a 10,0 ppm porém em válvulas cardíacas a liberação residual de GTA se mostrou vantajosa pois o crescimento celular não é desejável nessa situação (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996).

2.4 Reações de reticulação da gelatina com polifenois

O termo "polifenol" deve ser usado para definir os metabólitos secundários de plantas derivados exclusivamente da via dos fenilpropanoides e/ou policetídeos derivados do chiquimato, tendo mais de um anel polifenólico e sendo destituído de qualquer grupo funcional de nitrogênio em sua estrutura mais primitiva. No Reino

Vegetal, estão relacionados a funções que incluem a resistência em relação a microorganismos patogênicos e animais herbívoros como os insetos e a proteção em relação à radiação solar que provavelmente foi um fator determinante na evolução das plantas terrestres (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Os polifenois podem ser citados entre os novos agentes reticulantes obtidos de fontes naturais. Alguns grupos estudaram essas reações de reticulação tais como Bigi e colaboradores (2002) que obtiveram filmes de gelatina estáveis utilizando soluções de genipina, um glicosídeo iridoide, geniposidío, presente em abundância nos frutos da gardênia (*Gardenia jasminoides*); Strauss e Gibson (2004) que demonstraram que micropartículas de gelatina/pectina podem ser reticuladas com polifenois presentes no suco de uva e no café; Kosaraju e colaboradores (2010) que obtiveram géis de gelatina com propriedades melhoradas por meio da reticulação com ácido cafeico apresentam estrutura orto-difenol (ou 1-hidróxi-2-metóxi).

A formação de estruturas moleculares rígidas por reações de orto-quinonas com proteínas é bem conhecida. Conforme apresentado pela **Figura 5**, a terminação difenol de um ácido fenólico ou outro polifenol (1) é prontamente oxidada para uma ortoquinona, por meio de enzimas nos tecidos vegetais ou por meio do oxigênio molecular. A quinona forma um dímero (2) em uma reação lateral, ou reage com os grupos amino ou sulfidrila das cadeias laterais dos polipeptídeos para formar ligações covalentes C-N ou C-S com o anel fenólico com regeneração da hidroquinona. A última pode ser reoxidada e ligar um segundo polipeptídeo, resultando em reticulação (3). De modo alternativo, duas quinonas, cada qual carreando uma cadeia, podem dimerizar, também resultando em reticulação (4). A ocorrência de tal mecanismo de reticulação é suportada pela identificação de dímeros do ácido fenólico e pela geleificação de soluções aquosas de ésteres polisacarídicos do ácido ferúlico tais como pentosanas e pectina do açúcar de beterraba (STRAUSS; GIBSON, 2004).




Fonte: Strauss; Gibson (2004)

2.5 Flavonoides

A via metabólica mais produtiva em termos de substâncias polifenólicas é a que leva aos flava/flavonoides. Estes compostos são metabólicos híbridos derivados da combinação de polipropanoides derivados das vias do chiquimato (\rightarrow C₆-C₃) e os policetídeos derivados das vias do acetato/malonato (\rightarrow C₆). Apesar dessa origem biosintética comum, os flavonoides incluem várias subclasses de substâncias

estruturalmente diversas. Até hoje, mais de 8000 estruturas foram classificadas como pertencentes a essa classe de produtos naturais e seus usos e propriedades são bem conhecidos, em particular, os efeitos antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CHOQUENET *et al.*, 2008).

Os flavonoides encontram-se divididos em subgrupos que incluem os flavonóis (quercetina, mericitina e rutina), flavanonas (hesperidina), antocianidinas (malvidina, cianidina e apigenidina), flavonas (crisina e apigenina) e flavanóis (catequina, epicalocatequina e epicatequina, entre outros). As diferenças dentro de cada grupo estão relacionadas com a variação no número e na posição dos grupamentos hidroxila, modificações nos núcleos e no grau de metilação e glicosilação (DUGAS *et al.*, 2000; FILHO *et al.*, 2001).

A representação esquemática do núcleo comum dos flavonoides é apresentado na Figura 6.



Figura 6: Representação esquemática do núcleo comum fundamental dos flavonoides (estrutura química geral)

Fonte: Heim; Tagliaferro; Bobilya (2002)

Em sua forma estrutural mais elementar, anel fenólico com grupamento hidróxi, a função fenol se constitui como uma terminação anfifílica que combina o caráter hidrofóbico de seu núcleo aromático plano com o caráter hidrofílico de seu substituinte polar hidróxi, podendo atuar como doador ou ligante de hidrogênio. A presença de pelo menos dois grupamentos hidróxi adjacentes no anel fenólico permite a quelação de metais. Além disso, comparada com a absorção secundária máxima do benzeno em água a 254 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), a do fenol é deslocada para 270 nm. A presença adicional de um grupo hidróxi e/ou grupos removedores de elétrons na posição *para* tais como o grupo carbonila ou propenoil ester, que são frequentes nos polifenóis de plantas, deslocam a absorção máxima de forma a proporcionar proteção em relação à radiação solar do tipo UVB e existem estudos que sugerem

que a incidência desse tipo de radiação influencia o acúmulo de flavonoides, tais como a rutina, em determinados tipos de espécies vegetais (QUIDEAU *et al.*, 2011; ZHANG; BJÖRN, 2009).

2.6 Proteção solar

O espectro solar que atinge a superfície terrestre é formado, predominantemente, por radiações ultravioletas (UV) (100-400 nm), radiações visíveis (400-780 nm) e radiações infravermelhas (acima de 780 nm) (BALOGH *et al.*, 2011).

O espectro UV é subdividido em três categorias: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm). A radiação do tipo UVA ainda é subdividida em UVAI (340-400 nm) e UVAII (320-340 nm) (BRASIL, 2012b).

A energia da radiação é inversamente proporcional ao tamanho do comprimento de onda. Sendo assim, a radiação UVC, também denominada de bactericida, é a mais energética e fotoativa, porém não constitui ameaça à maioria da população, pois quase sua totalidade é filtrada pela camada de ozônio. A radiação UVB, que compreende apenas cerca de 5% da radiação UV total, é a responsável pela maioria dos eventos fotobiológicos agudos e crônicos quando absorvida pela epiderme, tais como os distúrbios de pigmentação, eritema, degeneração das fibras elásticas, imunossupressão e fotocarcinogênese, entre outros. A radiação UVA atinge as camadas mais profundas da pele, comprometendo gradativamente a integridade das fibras de elastina e colágeno da derme, sendo a responsável pelo fotoenvelhecimento e pela indução precoce do câncer (EPSTEIN, 1990).

Uma das estratégias para proteger a pele dos danos causados pela radiação solar é o uso de formulações contendo filtros solares, denominadas de protetores solares. Segundo a *World Health Organization* (WHO), os fotoprotetores fazem parte da classe terapêutica dos emolientes-protetores dérmicos (D02A0 - Classificação Anatômica terapêutica). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classifica-os como produtos cosméticos de Grau II, ou seja, são produtos que possuem indicações específicas cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Recentemente, foi aprovado pela Anvisa o regulamento técnico sobre

protetores solares que contém padronização conceitual, rotulagem de produtos e as diretrizes metodológicas que devem ser adotadas pelos países do Mercosul (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012b; GUARATINI *et al.*, 2009).

Os filtros solares são subdivididos em duas classes: filtros orgânicos e filtros inorgânicos, classificados como filtros de efeito químico (filtros químicos) e filtros de efeito físico (filtros físicos). Geralmente, os compostos orgânicos protegem a pele pela absorção da radiação e os inorgânicos pela reflexão da radiação. Porém, atualmente, existem filtros orgânicos no mercado que, além de absorverem, também refletem a radiação UV (Ciba especialidades químicas "*methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutyl-phenol-MBBT*", Tinossorb[®] M) (FLOR; DAVOLOS; CORREIA, 2007).

As moléculas dos filtros de efeito químico possuem duplas ligações que permitem que os elétrons que se encontram em orbitais de mais baixa energia absorvam a radiação UV incidente e sejam excitados para orbitais de mais alta energia, realizando a conversão das radiações de alta energia e pequenos comprimentos de onda, que são danosas, em radiações de pequena energia e altos comprimentos de onda que são inofensivas aos seres humanos. Tais moléculas são subdivididas em filtros UVB, que exercem proteção frente à radiação UVB, filtros UVA, que exercem proteção frente à radiação UVA e filtros de amplo espectro, que promovem proteção frente à radiação UVA e UVB (BALOGH *et al.*, 2011; MENDONÇA, 1998).

Os filtros UVB absorvem aproximadamente 90,0 % da radiação no comprimento de onda entre 290 nm a 320 nm. Nesse grupo encontram-se: PABA (ácido 4-aminobenzoico), que foi o primeiro filtro UV utilizado e um dos primeiros aprovados pelo FDA, cinamatos, salicilatos e octocrileno. Os cinamatos são os filtros UVB mais populares na Europa e nos EUA, entretanto, muitas vezes são combinados com os demais filtros por apresentarem substantividade reduzida (BALOGH *et al.*, 2011, SAMBANDAN; RATNER, 2011).

A benzofenona-3 (BZ3) é a benzofenona mais utilizada como filtro químico na região do UVA. Apresenta dois picos de absorção, um na região do UVB e outro na região do UVA2 (comprimento de onda máximo de 288 nm e 325 nm). Além das benzofenonas, outras substâncias que exibem ação na região do UVA são antralinatos, canforados, entre outras (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

Os filtros químicos apresentam problemas relevantes relacionados à fotoalergenicidade e à irritação da pele, adicionalmente, são fotoinstáveis,

favorecendo a formação de produtos inativos ou, muitas vezes, tóxicos (radicais livres) quando em contato com a radiação solar (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006). Tal cenário tem impulsionado a busca de alternativas para minimizar ou eliminar tais efeitos e existe a tendência do desenvolvimento de fotoprotetores com concentração reduzida de filtros químicos e de proteção elevada frente às radiações UVA e UVB (SCHLUMPF *et al.*, 2004).

Os flavonoides rutina (3-o-rutosídeo-guercetina) e guercetina (3,3',4',5,7pentahidróxi-flavona) têm sido estudados como agentes fotoprotetores de uso tópico. Casagrande e colaboradores (2006) observaram que formulações contendo quercetina inibiram o dano induzido por radiações do tipo UVB em camundongos; Velasco e colaboradores (2008) observaram que a eficácia fotoprotetora da rutina em formulações cosméticas é dependente da presença dos filtros UVA e UVB, ocorrendo sinergismo na elevação do Fator de Proteção Solar (FPS) quando o flavonoide foi associado aos filtros nas concentrações mínimas. Além disso, também verificaram que a rutina não associada aos filtros químicos exerceu proteção frente à radiação UVA superior à formulação ausente de compostos ativos e às suas associações; Choquenet e colaboradores (2008) observaram que emulsões contendo rutina e quercetina apresentaram FPS similares ao homosalato, substância indicada como padrão de comparação para FPS, e também apresentaram atividade anti-UVA. Também observaram FPS próximo de 30 na associação desses flavonoides com o dióxido de titânio; Vicentini e colaboradores (2010) observaram que microemulsões A/O contendo quercetina reduzem a incidência de alterações histológicas na pele de camundongos sem pelos, induzidas pela exposição à radiação UVB.

As pesquisas de novas moléculas fotoestáveis para utilização em protetores solares são extensivamente realizadas, sendo que, atualmente, se destaca interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais (GUARATINI *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Obter microesferas de gelatina

3.2. Reticular as microesferas de gelatina obtidas com GTA ou com RUT

3.3. Caracterizar as propriedades físico-químicas das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT

3.4. Avaliar o potencial de aplicação das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT em fotoprotetores

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

O **Quadro 01** contém os equipamentos utilizados para a realização do presente trabalho.

Quadro 1: Equipamentos	empregados para a	realização do	presente trabalho
------------------------	-------------------	---------------	-------------------

Descrição	Marca	Modelo			
Agitador magnético	Nalgon®	Speedlab			
Agitador mecânico	IKA®	RW 20			
Analisador de adsorção gasosa	Quantachrome Corporation [®]	NOVA 2200e			
Analisador de tamanho de partículas a laser	CILAS®	1090L			
Balança analítica	Shimadzu®	AUY220			
		AUW 220D			
Balança semianalítica	Gehaka [®]	BG 4000			
Balança semianalítica	OHAUS®	ARD 110			
Banho termostatizado	Nova Ética [®]	N480			
Banho ultrassônico	Unique [®]	Ultrasonic Cleaner			
Célula calorimétrica	Seiko [®]	DSC7020 SII Extar			
Centrífuga	Quimis®	Q222T104			
Espectrofotômetro de refletância com esfera de integração	Labsphere [®]	UV2000S			
Espectrofotômetro UV- VIS	Thermo Scientific [®]	Evolution 600			
Metalizador de amostras	Bal-Tec/Leica®	MD020			
Micropipetas: 10-100µl, 100-1000µl, 1-10 mL	Eppendorf [®]	Research plus			
Microscópio	Olympus [®]	BX50			
Microscópio eletrônico de varredura	FEI [®] Company	Quanta 600 FEG			
Peagômetro	Quimis [®]	Q400AS			
Picnômetro de gás Hélio	Quantachrome Corporation [®]	Ultrapycnometer 1000			
Placa aquecedora em cerâmica com	IKA®	CMAG HS7			
agitação magnética		CMAG HS10			
		CMAG HP10			
Sistema purificador de água - Osmose Reversa	Gehaka [®]	OS10LX			

4.1.2 Materiais diversos

O **Quadro 02** descreve os materiais diversos utilizados para a realização do presente trabalho.

Quadro 2: Materiais diversos utilizados para a realização do presente trabalho

Descrição	Marca	Especificação
Cadinho ou panela de alumínio para	Seiko®	-
análise térmica		
Cadinho ou panela de platina para análise	Seiko®	-
térmica		
Cubeta de Quartzo	Hellma®	100-QS-10MM/3,5 mL
Fita adesiva dupla face de carbono	Agar Scientific [®]	8,0 mm X 20,0 m
Fita adesiva transparente	3M [®] e Nexcare [®]	50,0 mm X 4,5 m, Transpore [®]
Lâminas de vidro para microscopia	Star Frost [®]	26,0 X 76,0 X 1,0 mm com
		extremidades coloridas
Lamínulas de vidro para microscopia	Perfecta®	20,0 mm X 20,0 mm
Pipeta Pasteur de polietileno	Prolab	3,0 mL
Placa de quartzo	-	50,0 mm X 50,0 mm
Seringa plástica	BD [®]	1,0 mL
Tamis	-	Mesh 80
		(Tyler 180, abertura 0,177 mm)
Tubo capilar de vidro sem heparina	Perfecta®	75,0 mm X 1,0 mm X 1,5 mm
Tudo plástico	BD®	15,0 mL, 50,0 mL
	Corning [®]	
	Falcon [®]	

4.1.3 Matérias-primas e reagentes

O **Quadro 3** descreve as matérias-primas e reagentes utilizados para obtenção, reticulação e análise das microesferas de gelatina.

Quadro 3: Matérias-primas e reagentes empregados para obtenção, reticulação e análise das microesferas de gelatina.

Denominação Comercial	Denominação Química	Nº CAS	Fornecedor				
Acetona P.A. – A.C.S.	Dimetilcetona, 2-Propanona, Propan-2-ona ou Propanona	67-64-1	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
Ácido clorídrico 37% P.A. – A.C.S.	Ácido clorídrico, Cloreto de hidrogênio, Ácido hidroclorídrico	7647-01-0	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
Ácido picrilsulfônico, sol. aq. 5,0% P.A.	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	2508-19-2	Sigma-Aldrich Brasil Ltda.				
Álcool propílico (Iso) P.A. –	Isopropanol	67-63-0	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
A.C.S.	2-propanol						
Água purificada	Água	7732-18-5	(-)				
Bicarbonato de sódio P.A.	Bicarbonato de sódio, Hidrogênio carbonato de sódio	144-55-8	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
Dhaytan [®] S80	Monooleato de sorbitan	1338-43- 8	Dhaymers Ind.Com. Prod.Químicos Ltda.				
Gelatina bovina	Gelatina	9000-70-8	NP – Com. Produtos				
grau alimentício, Bloom 180, Mesh 30			Anneniicios Liua.				
Glutaraldeído solução, grau	Pentano-1,5-diol	111-30-8	Sigma-Aldrich Brasil				
1, Solução aquosa 25%	1,5-pentanadial		Liua.				
Hidróxido de sódio lentilhas P.A.	Hidróxido de sódio	1310-73-2	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
Leucina-L P.A.	Ácido 2-amino-4-metilpentanóico	61-90-5	LabSynth Ind.Com. Ltda.				
Nltrogênio	NItrogênio	7727-37-9	White Martins Gases Industriais Ltda.				
Óleo Mineral USP 70	Mistura de hidrocarbonetos	8012-95-1;	Volp Ind.Com. Ltda				
	aromáticos, ciclo parafinicos e aromáticos saturados e insaturados provenientes da destilação do petróleo	8042-47-5	PharmaSpecial Esp. Químicas e Farm. Ltda.				
Rutina	3-o-rutosídeo-quercetina	153-18-4	Fagron do Brasil				
	3, 3', 4', 5, 7 – pentahidroxiflavona – 3 – rutinosídeo						

Legenda: (-) fornecedor não descrito. Material obtido no Laboratório de Cosmetologia da FCF-USP, por meio de Sistema Purificador de Água - Osmose Reversa.

CAS: Número de registro presente no banco de dados do Chemical Abstract Service; P.A.: Para Análise, Grau Analític; A.C.S.: America Chemical Society

O Quadro 4 contém as matérias-primas utilizadas para a obtenção das

dispersões para avaliação da atividade fotoprotetora in vitro.

Quadro 4 : Matérias-primas empregadas na preparação das dispersões para a avaliação de atividade fotoprotetora *in vitro*

Denominação	Denominação	Denominação	N° CAS	Fornecedor				
Comercial	Química	INCI						
Seleron [®] BZP3	2-hidroxi-4- metoxibenzofenona	Benzophenone-3	131-57-7	PharmaSpecial Esp. Químicas e Farm. Ltda				
Crodabase [®] SQ	Óleo Mineral (e) Polietileno	Mineral oil (and) Polyethylene	8012-95-1, 8042-47-5, 8020-83-5, 9002-88-4	Daltomare Química Ltda.				
Óleo Mineral	Mistura de	Paraffinum Liquidum	8012-95-1;	Volp Ind.Com. Ltda				
USP 70	parafínicos, ciclo parafínicos e aromáticos saturados e insaturados provenientes da destilação do petróleo		8042-47-5	PharmaSpecial Esp. Químicas e Farm. Ltda.				
Octilmetoxicinamato	2-etilhexil metoxicinamato;	Ethylhexyl methoxycinnamate	5466-77-3	PharmaSpecial Esp. Químicas e Farm.				
	2-etilhexil- <i>p</i> - metoxicinamato;			Ltda				
	ácido 2-proenóico,							
	3-(4-metoxifenill)-2 – etilhexil éster							

Legenda: CAS: Número de registro presente no banco de dados do Chemical Abstract Service

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção das microesferas de gelatina

As microesferas de gelatina foram obtidas pelo método de polimerização em emulsão, utilizando tensoativo e extração com solvente conforme Tanaka e colaboradores (1963) e Ugwoke e Kinget (1998), com modificações, conforme descrito a seguir.

Uma solução aquosa de gelatina a 10,0% p/p (240,0 g) foi obtida entre 50,0 °C a 55,0 °C com emprego de placa aquecedora de cerâmica com agitação magnética na velocidade média. Esta foi transferida, por gotejamento com pipeta plástica, para uma mistura de óleo mineral (560,0 mL) e monooleato de sorbitan (concentração final de 1,0% p/v), envolvendo aquecimento de 50,0 °C a 55,0 °C, em placa aquecedora de cerâmica, e agitação mecânica a 2400 rpm (haste/hélice de disco bidentado). A emulsão resultante foi mantida nas condições antes descritas por 15 minutos e, depois, foi resfriada até temperatura ambiente (20,0°C a 25,0°C) com auxílio de banho de água e agitação de 2400 rpm. Após, para possibilitar a geleificação da amostra, a emulsão foi resfriada até atingir entre 10,0 °C a 15,0 °C com banho de gelo, sob agitação. Após 30 minutos, acetona previamente resfriada até atingir entre 5,0 °C a 10,0 °C (400,0 mL) foi adicionada por gotejamento com bureta à emulsão e a mistura foi agitada por outros 30 minutos, entre 10,0 °C a 15,0 °C, et depois foi fracionada em tubos plásticos de 50,0 mL para ser centrifugada.

Posteriormente à centrifugação (2 minutos, 3400 rpm e temperatura ambiente), o sobrenadante dos tubos foi descartado. À quantidade de resíduo sólido foi adicionado igual volume de acetona resfriada entre 5,0 °C a 10,0 °C e, após mistura manual com bastão de vidro, os tubos foram novamente centrifugados a 3400 rpm por 2 minutos. Tal procedimento foi repetido por três vezes.

Após a última lavagem com acetona, os resíduos sólidos foram unificados e transferidos para recipiente de vidro aberto onde ocorreu secagem à temperatura ambiente por, pelo menos, 12 horas.

O resíduo seco foi tamisado em tamis mesh 80 (abertura de 0,177 mm) pesado em balança semianalítica e armazenado em frasco fechado devidamente identificado com número de lote, por meio da combinação no mês, dia e ano de obtenção.

O fluxograma do processo de obtenção das microesferas de gelatina pelo método de polimerização em emulsão utilizando tensoativo e extração com solvente é apresentado na **Figura 7**.



Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção das microesferas de gelatina pelo método de polimerização em emulsão, utilizando tensoativo e extração com solvente

4.2.2 Reticulação das microesferas de gelatina

As microesferas de gelatina de um mesmo lote, obtido conforme descrito em **4.2.1**, foram subdivididas em três grupos:

- Microesferas de gelatina não reticuladas (M0)
- Microesferas de gelatina reticuladas com GTA (MG)
- Microesferas de gelatina reticuladas com RUT (MR)

O meio de reticulação dos grupos das microesferas de gelatina reticuladas consistiu na mistura de acetona: NaOH 0,01 M (70:30 v/v). Foi utilizada a proporção de 5,0 g de microesferas para cada 100,0 mL de meio de reticulação.

Os agentes reticulantes foram GTA (concentração final: 0,1% p/v, equivalente a 10,0 mM) e RUT (concentração final: 0,6% p/v, equivalente a 10,0 mM).

O processo de reticulação foi realizado por quatro horas com agitação magnética na velocidade máxima e à temperatura ambiente (entre 20,0 °C e 25,0 °C). Após esse período, o meio de reticulação foi removido e as microesferas reticuladas foram lavadas por cinco vezes com acetona e agitadas, por 15 minutos, com agitação magnética na velocidade máxima.

Posteriormente, as microesferas reticuladas foram mantidas em recipiente de vidro aberto para permitir a secagem ao ar livre por, pelo menos, 12 horas. As microesferas foram tamisadas em tamis mesh 80 (abertura de 0,177 mm) e armazenadas em frasco plástico fechado e devidamente identificado.

O fluxograma do processo de reticulação das microesferas de gelatina é apresentado na Figura 8.





4.2.3 Aspecto por microscopia eletrônica de varredura

O aspecto (morfologia) da gelatina, M0, MG e MR foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram observadas amostras a seco e em meio aquoso do lote de gelatina utilizado para obtenção das micropartículas e de três lotes diferentes de cada grupo.

Aproximadamente 5,0 mg de cada amostra foram fixados com fita de carbono dupla face (Agar Scientific[®]) em suporte metálico de 12,0 cm de diâmetro, próprio para microscopia eletrônica, e, em seguida, foram metalizadas com filme fino de platina, utilizando-se metalizador de amostras (Bal-Tec/Leica[®] ED020), conforme ilustrado na **Figura 9**.



Figura 9 : Amostras fixadas em suporte metálico e metalizadas em filme fino de platina para obtenção de micrografias em MEV

A observação das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura FEI[®] Quanta 600 FEG (*Field EmissionGun*) do Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

As imagens foram obtidas no modo alto vácuo, utilizando-se detector ETD (Everhardt-Thronley *detector*) de elétrons secundários, aceleração de 10 kV, WD (*working distance*) de 10,0-10,4 mm e *spot* 2,0, com aumentos de 150 a 50.000 vezes.

4.2.4 Determinação do percentual de intumescimento com avaliação visual por microscopia óptica comum

Amostras de, aproximadamente, 50,0 mg do lote de gelatina utilizado para obtenção das micropartículas e de três lotes diferentes de M0, MG e MR foram adicionadas a 10,0 mL de água purificada e mantidas em repouso, em temperatura ambiente (entre 20,0 °C e 25,0 °C), por três diferentes períodos de tempo a fim de observar o comportamento de intumescimento em meio aquoso, conforme descrito a seguir:

- tempo zero adição da água foi realizada imediatamente antes da observação em microscópio. Essas amostras foram utilizadas como padrão de comparação para avaliar o percentual de intumescimento nos demais períodos;
- tempo 1 repouso em meio aquoso pelo período de 1dia;
- tempo 2 repouso em meio aquoso pelo período de 7 dias.

Cada grupo de amostra foi depositado sobre lâmina para microscopia com tubo capilar de vidro e recoberto com lamínula. As medições dos diâmetro das micropartículas e a observação da gelatina foram realizadas utilizando-se microscópio Olympus[®] BX 50 com sistema de captura de imagem acoplado e o programa Image-Pro Plus[®], versão 7.0 (MediaCybernetics), para análise e tratamento de imagem.

As leituras foram obtidas com aumento de 20 vezes e luz não polarizada. Para cada lâmina, foram selecionados, pelo menos, quatro campos representativos que foram fotografados e submetidos à mensuração automática de diâmetro.

4.2.5 Determinação da extensão da reticulação

A extensão da reticulação foi determinada pela medição da absorbância do cromóforo formado na reação dos grupos ε-amino livres da M0, da MG e da MR com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), utilizando o método descrito por Sheu e colaboradores (2001), com modificações. Também foram realizadas leituras do lote de gelatina utilizada para obtenção das micropartículas.

Em tubos plásticos de 15,0 mL, foram pesados em balança analítica cerca de 10,0 mg a 15,0 mg de cada amostra. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 1,0 mL de solução de NaHCO₃ 4,0% (p/v) e 1,0 mL de solução recém preparada de TNBS 0,5% (p/v). Os tubos foram transferidos para banho termostatizado e foram mantidos nessa condição por 2 horas.

Após esse período, a reação do TNBS foi interrompida pela adição de 3,0 mL de HCI 6,0N e os tubos foram transferidos para banho ultrassônico, onde permaneceram entre 60,0 °C a 62,0°C por 90 minutos, a fim de permitir a completa dissolução das amostras.

Posteriormente, foram adicionados 5,0 mL de água purificada a cada tubo. A solução resultante foi diluída a 1:10 com água purificada e submetida à leitura espectrofotométrica, em triplicata, a 345,0 nm em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm, utilizando Espectrofotômetro UV- VIS *Evolution* 600[®] (*Thermo Scientific*) e o programa *Vision* Pro[®] versão 4.4.1 (*Thermo Scientific*). O branco foi preparado pelo mesmo procedimento, exceto pelo momento de adição do HCI 6,0N, que ocorreu antes da adição da solução de TNBS 0,5% (p/v), a fim de inibir a formação do cromóforo.

Foi preparada curva padrão de L-leucina com intervalo de concentração de 0,0 mM até 3,0 mM, para calcular o conteúdo dos grupos ε-amino livres nas amostras, equivalentes em L-leucina, conforme descrito por Gan, Cheng e Easa (2009).

A extensão de reticulação foi calculada conforme apresentado na Equação 1.

Equação 1 : Extensão de reticulação das microesferas de gelatina **Fonte:** SHEU *et al.* (2001)

4.2.6 Determinação da área superficial

As determinações de área superficial e porosidade foram realizadas em analisador de adsorção gasosa NOVA 2200e (*Quantachrome Corporation*[®]).

Um porta-amostra de vidro vazio foi pesado e, em seguida, adicionou-se a amostra de forma a completar 2/3 do bulbo terminal. Essa foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido por 20 minutos e, em seguida, analisada.

Para cada amostra, obteve-se isoterma de 50 pontos, sendo 30 de adsorção e 20 de dessorção de gás nitrogênio ultra-puro, a pressão relativa (P/P0) entre 0,05 e 0,95.

A partir das isotermas foram obtidos gráficos de multi-BET, que foram empregados para o cálculo da área superficial. Os resultados foram gerados pelo programa NOVA-Win[®] P 9.0.

4.2.7 Determinação da densidade verdadeira

A determinação da densidade verdadeira das amostras foi realizada em picnômetro de gás hélio, *Ultrapycnomete*r 1000 (*Quantachrome Corporation*[®]).

Aproximadamente, 1,5 g a 4,0 g de cada amostra foram submetidas a três medições sucessivas de volume e densidade e, ao final, foi determinada a densidade média.

4.2.8 Determinação da distribuição granulométrica

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada em analisador de tamanho de partículas a *laser* CILAS[®] 1090L.

Quantidade suficiente de amostra para obter a obscuração adequada foi dispersa em 50 mL de álcool isopropílico e submetida à leitura com intervalo de 0,04 a 500 µm por 100 classes, com intervalo de 30 segundos entre medições e limpeza, sem emprego de ultrassom ou diluição automática.

4.2.9 Análise calorimétrica

A caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC), a análise termogravimétrica (TG) e a análise térmica diferencial foram realizadas em analisador térmico Seiko[®] DSC7020 SII Extar.

A caracterização por DSC foi realizada em célula TA-2920 previamente calibrada com índio metálico (ponto de fusão: 156,4°C/ $\Delta H_{fusão}$ 28,50 J/g) no intervalo de temperatura de 25°C a 320°C. Aproximadamente, 2,0 a 4,0 mg de amostras foram pesadas em recipientes selados de alumínio e submetidos à razão de aquecimento de 10,0 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50,0 mL/min, com variação de temperatura de 25,0 °C a 350,0 °C.

As curvas de TG/DTA foram obtidas a partir de, aproximadamente, 2,0 mg a 10,0 mg de amostras acondicionadas em cadinho de platina. O ensaio foi realizado utilizando-se razão de aquecimento de 5,0 °C/min, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100,0 mL/min e intervalo de temperatura de 25,0 °C a 600,0 °C.

4.2.10 Preparo de dispersões

Foram preparadas dispersões em óleo mineral e Crodabase[®] SQ contendo gelatina não tratada, M0, MG, MR, benzofenona-3 (BZ3) e octilmetoxicinamato (OCT), isolados ou combinados, a fim de obter *in vitro* a atividade fotoprotetora.

O óleo mineral e a Crodabase[®] SQ foram aquecidos entre 80,0 °C a 85,0 °C e homogeneizados por agitação manual com bastão de vidro (dipersão base).

A adição do octilmetoxicinamato à dispersão base ocorreu a frio, com posterior aquecimento entre 80,0 °C a 85,0 °C e agitação manual com bastão de vidro devido ao volume preparado ser reduzido (10,0 g) e impossibilitar o uso de agitação mecânica.

A adição da BZ3 à dispersão ocorreu entre 80,0 °C a 85,0 °C, a fim de promover a sua dissolução e incorporação ao meio com agitação manual.

A incorporação de gelatina, M0, MG, MR ocorreu por agitação manual somente após o resfriamento da dispersão até temperatura ambiente (entre 20,0 °C a 25,0 °C), a fim de se evitar a desestruturação dessas matérias-primas.

As matérias-primas foram pesadas em quantidade suficiente para o preparo de 10,0 g de cada dispersão, conforme composição percentual (% p/p) apresentada na **Tabela 1**.

	Proporção (% p/p)																			
Composição	A	В	С	D	Е	F	G	Н	I	J	к	L	М	N	0	Ρ	Q	R	S	т
Óleo Mineral	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Crodabase [®] SQ	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	44,0	39,0	39,0	39,0	39,0	42,5	37,5	37,5	37,5	37,5	36,5	31,5	31,5	31,5	31,5
Gelatina	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-
МО	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-
MG	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-
MR	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,0
BZ3	-	-	-	-	-	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	-	-	-	-	-	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
ОСТ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

Tabela ²	1 · Comi	nosicão	percentual	(%)	n/n)	das	dispersões	utilizadas	nara	verificad	cão de	e anlicabilidade
Tabcia	• . Oom	posição	percentuar	0	ρ/ ρ/	uus	uispei 3003	utilizadas	para	vermeaç	,ao ac	

Legenda A a T: dispersões

(-): matéria-prima não adicionada

M0: Microesferas não reticuladas

MG: Microesferas reticuladas com glutaraldeído.

MR: Microesferas reticuladas com rutina.

BZ3: benzofenona-3

OCT: octilmetoxicinamato

4.2.11 Atividade fotoprotetora in vitro: FPS e proteção frente à radiação UVA

Para a caracterização funcional *in vitro* das amostras foi utilizado espectrofotômetro de refletância difusa, equipado com esfera de integração (Labsphere[®] UV-2000S UV *Transmittance Analyzer*). Visando mimetizar as propriedades de superfície da epiderme humana, foi utilizado como substrato placa de quartzo recoberta com fita adesiva transparente do tipo Transpore[®] (SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2008).

Alíquotas das amostras de 0,75 mg/cm² foram aplicadas uniformemente, sob a forma de filme, em movimentos circulares sobre a superfície do substrato. Os registros dos valores espectrofotométricos da absorbância foram realizados em intervalo de comprimento de onda entre 290,0 e 400,0 nm, na taxa de progressão de 1,0 nm. Para cada amostra foram preparadas três placas para obtenção do FPS *in vitro* (COLIPA, 2009; DIFFEY *et al., 2000*; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; VELASCO *et al.*, 2008).

Foram preparadas, pelo menos, três dispersões de cada tipo descrito na **Tabela 1** contendo os mesmos lotes de gelatina, BZ3, OCT, óleo mineral e Crodabase[®] SQ, e lotes diferentes de M0, MG e MR para determinação do FPS *in vitro*.

O FPS *in vitro* foi calculado por meio da **Equação 2** por meio do programa do Labsphere[®] UV-2000S UV *Transmittance Analyzer*.

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda T\lambda d\lambda}$$

Equação 2 : Fator de proteção solar estimado

Legenda: E = eficácia eritematógena espectral da CIE; S = irradiância solar espectral; T = transmitância espectral da amostra; d= intervalo dos comprimentos de onda = 1 nm Fonte: SPRINGSTEEN *et al.* (1999)

4.2.12 Análise de resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para determinação inter e intragrupos. Foi utilizado o programa Minitab[®] versão 16 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1 Obtenção das microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas

As microesferas de gelatina obtidas pelo método de polimerização em emulsão utilizando tensoativo e extração com solvente apresentaram-se como pó fino de coloração levemente amarelada (**Figura 10 b**), diferente do aspecto de pó grosseiro e amarelado da gelatina, na qualidade de matéria-prima, (**Figura 10 a**) que foi utilizada para sua obtenção. Após o processo de reticulação em meio orgânico constituído por NaOH:acetona, o aspecto do pó foi alterado para levemente bege (**Figura 10 c**) quando o GTA foi o agente reticulante e para amarelo-esverdeado (**Figura 10 d**) quando o agente reticulante foi a RUT.





A fim de quantificar o rendimento dos processos de obtenção e reticulação, as microesferas de gelatina obtidas após a etapa de tamisação foram pesadas e comparadas com a massa inicial utilizada em cada processo (com a massa de gelatina para o processo de obtenção e com a massa de microesferas para os processos de reticulação com GTA ou com RUT).

O rendimento do processo de obtenção foi de aproximadamente 75% enquanto que no processo de reticulação foram observados rendimento superiores a 80%, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2 : Rendimentos dos processos de obtenção e reticulação das microesferas. Os resultados estão expressos como rendimento percentual p/p da média ± desvio padrão (n=4)

Processo	Rendimento de processo (%)
Obtenção	74,8 ± 8,5
Reticulação com GTA	82,0 ± 13,3
Reticulação com RUT	85,1 ± 9,1

Legenda: GTA : Glutaraldeído; RUT: Rutina

A perda de aproximadamente 25,0 % no processo de obtenção das microesferas pode ser justificada principalmente pela separação e descarte da gelatina de baixo peso molecular no sobrenadante da emulsão quando ocorreu a adição de acetona que é um agente desolvatante que precipita a gelatina de alto peso molecular (NAHAR *et al.*, 2008). Além disso, ocorreram perdas na transferência entre o recipiente de preparo e os tubos de centrifugação e na tamização quando agregados maiores que a abertura do tamis (mesh 80 = 177,0 µm) foram separados e descartados.

A perda entre 15,0% e 18,0 % observada no processo de reticulação das microesferas pode ser explicada principalmente pelo processo de separação por tamização e às lavagens com acetona.

Na obtenção das microesferas, foi observado que a etapa de adição de acetona após a emulsificação e geleificação é bastante crítica. Ugwoke e colaboradores (1998) descrevem que esta adição deve ser feita sob agitação. Além disso, foi constado que a adição deve ser lenta e contínua com auxílio de bureta, pois a adição de todo o conteúdo de acetona leva à precipitação da gelatina e à formação de aglomerado esbranquiçado, conforme apresentado na **Figura 11**.



Figura 11 : Aglomerado de gelatina obtido por adição rápida de acetona

Para realizar a reticulação das micropartículas de gelatina, foi utilizado meio composto por acetona e NaOH 0,01 M. Tal escolha foi direcionada por questões de solubilidade das microesferas de gelatina e da RUT.

A tentativa de reticular as microesferas de gelatina com RUT dissolvida em meio aquoso e alcalino resultou na destruição das microesferas e obtenção de filme contínuo de coloração amarelada, conforme apresentado na **Figura 12**.



Figura 12 : Filme de gelatina obtido por reticulação das microesferas de gelatina com RUT em meio aquoso e alcalino

A gelatina é insolúvel em meio orgânico e vários autores descrevem o uso de solventes orgânicos como meio de reticulação para micropartículas de gelatina. O isopropanol é descrito por Tanaka (1963), Forni (1992) Kong (2011), o etanol é descrito por Franz (1998), Liang (2003), Yao (2004) e Wei (2007), o tolueno é dfescrito por Dirnavand (2003 e 2005) e Patel (2006) e a acetona é descrita por Vandelli (2001) e Kasper (2005) que utilizou uma mistura de acetona e HCI 0,01 M como meio de reticulação para microesferas de gelatina catiônicas.

No presente trabalho, a acetona foi escolhida como meio de reticulação por ter sido o solvente utilizado na etapa de obtenção. A mistura com NaOH 0,01 M surgiu como recurso para solubilizar uma maior quantidade de RUT no meio, que se apresentou como uma solução de coloração amarela.

No processo de reticulação, foram utilizados 0,6 g RUT/ 5,0 g de microesferas de gelatina, que correspondem a 10,0 mM de RUT ou 0,12 g RUT/g de microesferas de gelatina e 400,0 μ L GTA/ 5,0 g de microesferas de gelatina, que correspondem a 10,0 mM de GTA e 0,02 % GTA/g de microesferas de gelatina.

5.2 Aspecto por MEV

O aspecto da gelatina, das microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas com GTA ou RUT foram observados por MEV e são apresentados na **Figura 13, Figura 14, Figura 15, Figura 16, Figura 17** e **Figura 18**.



Figura 13 : Fotomicrografia por MEV da gelatina, na qualidade de matéria-prima, em aumentos de (a) 150 vezes, (b) 650 vezes (c) 5.000 vezes



Figura 14 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina não reticuladas em aumentos de (a) 3.000 vezes, (b) 25.000 vezes e (c) 50.000 vezes



Figura 15 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina reticuladas com GTA em aumentos de (a) 3.000 vezes, (b) 25.000 vezes e (c) 50.000 vezes



Figura 16 : Fotomicrografia por MEV das microesferas de gelatina reticuladas com RUT em aumentos de (a) 3.000 vezes, (b) 25.000 vezes e (c) 50.000 vezes



Figura 17 : Fotomicrografia por MEV de: (a) microesferas de gelatina não reticuladas; (b),(c) microesferas de gelatina reticuladas com GTA. Aumentos de: (a) 30.000 vezes, (b) 20.000 vezes e (c) 15.000 vezes



Figura 18 : Fotomicrografia por MEV de microesferas de gelatina reticuladas com RUT em aumentos de (a) 30.000 vezes e (b) 50.000 vezes

Observa-se que a gelatina utilizada na obtenção das microesferas apresentou grânulos amorfos com tamanho superior a 100 μ m (**Figura 13 a,b**). No aumento de 5.000 vezes (**Figura 13 c**) é possível observar em detalhes a textura da gelatina sugerindo estrutura compacta e densa.

As microesferas de gelatina obtidas no presente trabalho apresentaram formato esférico e heterogeneidade de tamanho (**Figuras 14 a,b ,15 a,b, 16 a,b**). Tal observação confirma a descrição de variação de tamanho das partículas obtidas pelo método de polimerização em emulsão utilizando tensoativo e extração com solvente feita por Rabanel e colaboradores (2009).

Nos aumentos de 50.000 vezes (**Figuras 14 c, 15 c, 16 c**), é possível observar que a superfície de todos os grupos apresenta rugosidades leves sugerindo que a reticulação não teve impacto na morfologia da superfície das microesferas. Tal achado é contrário ao descrito por Choy e colaboradores (2008) que observaram enrugamentos expressivos na superfície de microesferas de gelatina reticuladas com GTA e ao descrito por Patel e colaboradores (2006) que obtiveram microesferas com superfície lisa. O uso de acetona e NaOH como meio de reticulação podem ter levado às diferenças observadas em relação ao descrito em literatura pois os últimos pesquisadores citados utilizaram água (CHOY *et al.*, 2008) e tolueno (PATEL *et al.*, 2006) como meios de reticulação.

A presença de aglomerados é maior nas microesferas reticuladas, com GTA ou RUT, do que nas microesferas não reticuladas (Figuras 13 a, 14 a, 15 a).

Entre as microesferas aglomeradas (Figura 17 a, b) é possível observar a presença de zonas de junção. Na Figura 17 c observa-se a fusão se duas microesferas dando origem a uma estrutura com formato de halteres.

A **Figura 18 a** apresenta microesferas reticuladas com RUT em aparente momento de quebra da zona se junção. É possível observar que na superfície da microesfera maior forma-se uma concavidade com formato similar ao da região de junção com a microesfera menor. A concavidade possui paredes inclinadas e de razoável profundidade que sugerem que a estrutura interna da microesfera é maciça e sem a presença de poros.

Na microesfera em evidência na **Figura 18 b**, é possível observar em primeiro plano uma zona de junção desfeita que resultou em achatamento da superfície e zonas de junção em prolongamento e de contato direto com microesferas adjacentes.

5.3 Intumescimento

A avaliação do intumescimento de géis ou microesferas de gelatina pode ser realizada por meio de métodos gravimétricos ou volumétricos que comparam o comportamento em meio aquoso durante períodos de tempo específicos e estabelecem uma relação inversamente proporcional entre a captação de água e a extensão de reticulação (YOUNG *et al.*,2005, WEI *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2003; DINARVAND *et al.*, 2005).

A gelatina quando adicionada à água em temperatura inferior a 40,0 °C irá intumescer, absorvendo 5-10 vezes de seu peso em água, formado um hidrogel. O valor de intumescimento é pH dependente e atinge seu máximo em valores de pH distantes do ponto isoelétrico da gelatina utilizada (MOHOS, 2010).

O hidrogel formado pela gelatina é transparente e possui aspecto contínuo como pode ser observado na Figura 19.



Figura 19: Fotomicrografia de hidrogel de gelatina obtida por microscopia óptica comum em aumento de 400 vezes após 1 dia em temperatura ambiente (entre 20,0°C e 25,0 °C)

No processo de obtenção de microesferas de gelatina por polimerização em emulsão, utilizando tensoativo e extração com solvente , a gelatina é solubilizada em água aquecida a aproximadamente 40,0 °C. Nessa condição, as cadeias de gelatina estão em conformação espiral. Na etapa de resfriamento, ocorre a geleificação da gelatina com transição da conformação espiral reversa para helicoidal que é estabilizada por pontes de hidrogênio (DJABOROUV; LECHAIRE; GAILL, 1993).
As microesferas obtidas apresentaram aspecto esférico e em meio aquoso observou-se a formação de aglomerados que são mais evidentes nas microesferas não reticuladas e nas microesferas reticuladas com RUT. Após 7 dias em meio aquoso, as imagens em microscopia óptica com aumento de 400 vezes mostram que existe aumento do diâmetro das microesferas aglomeradas com manutenção da integridade e individualidade de cada unidade presente nos aglomerados, conforme apresentado pela **Figura 20**.



Figura 20: Fotomicrografias de microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas, em meio aquoso em diferentes períodos de tempo obtidas por microscopia óptica comum em aumento de 400 vezes

Legenda: (1): observação imediatamente após inclusão de meio aquoso; (2): observação após 1 dia em meio aquoso; (3): observação após 7 dias em meio aquoso; (A): microesferas não reticuladas; (B): microesferas reticuladas com GTA; (C): microesferas reticuladas com RUT

Após um dia em meio aquoso, não foi observado aumento de diâmetro estatisticamente significativo em nenhum dos grupos estudados. Após 7 dias, observou-se que ocorreu aumento de diâmetro estatisticamente significativo nas

microesferas não reticuladas e nas microesferas reticuladas com RUT sendo menor no grupo reticulado com RUT(**Tabela 3**).

Tabela 3 : Diâmetros das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT em meio aquoso e diferentes períodos de tempo. Os resultados estão expressos como diâmetro (μ m) ± desvio padrão da leitura de 3 campos por lâmina (n=60)

Amostra	Dia 0	Dia 1	Dia 7
MO	5,8 ^{a,a} ± 1,5	6,5 ^{a,a} ± 1,8	18,9 ^{b,a} ± 6,9
MG	2,9 ^{a,b} ± 0,9	2,9 ^{a,b} ± 1,0	$3,0^{a,b} \pm 0,2$
MR	5,8 ^{a,a} ± 3,5	6,4 ^{a,a} ± 1,7	14,3 ^{b,b} ± 1,5

Legenda: Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com ANOVA seguido de Tukey. A primeira letra refere-se à variação em função do tempo e a segunda letra refere-se à variação em função do tratamento. M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT.

As microesferas reticuladas com GTA não apresentaram variação significativa de diâmetro após 7 dias em meio aquoso. Tal resultado é similar ao observado por Bigi e colaboradores (2001) que descreveram que o GTA reduz o intumescimento de filmes de gelatina.

Tais observações sugerem que os agentes reticulantes utilizados foram efetivos na reticulação das microesferas de gelatina e que GTA foi superior à RUT.

5.4 Extensão de Reticulação

O ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS) foi desenvolvido para determinar os grupos amino livres de aminoácido e peptídeos em eluatos de colunas. Em condições alcalinas, o TNBS reage com os grupos amino livres formando derivados trinitrofenólicos (TNP) (**Figura 21**) que são cromóforos alaranjados passíveis de leitura espectrofotométrica na região do ultravioleta.



Figura 21 : Reação do TNBS com os grupos amino de proteínas para formar derivado trinitrofenólico (TNP)

Fonte: Modificado de Hermanson (2008)

A reação é terminada pela redução do valor de pH e deve ser conduzida sob proteção da luz, pois a reação no branco é acelerada pela exposição à luz. Os métodos utilizando TNBS surgiram como alternativa analítica aos métodos colorimétricos que utilizavam ninidrina (ADLER-NISSEN, 1979; HABEEB, 1966).

Para manusear amostras de materiais pouco solúveis, são descritos o uso recursos tais como a adição do tensoativo duodecilsulfato de sódio para denaturar proteínas (HABEEB, 1966), a inclusão de etapa de autoclavagem para promover hidrólise de microesferas de gelatina reticuladas com D,L-gliceraldeído (VANDELLI *et al.*, 2001) e o aumento de temperatura após a etapa redução de pH para término da reação do TNBS para solubilizar estruturas de colágeno reticuladas com carbodiimida (NAGAI *et al.*, 2004). No presente trabalho, foi utilizado o procedimento descrito por Nagai e colaboradores (2004) mantendo-se o tempo de 90 minutos e temperatura de 60,0 °C, porém incluindo o uso de banho ultrassônico a fim de solubilizar as amostras e possibilitar a leitura espectofotométrica.

Uma curva padrão de L-leucina com concentração de 0,0 a 3,0 mM pode ser usada para calcular a concentração de grupos amino livres presentes nas amostras. (ADLER-NISSEN, 1979; GAN,2009). A **Figura 22** apresenta a curva padrão de L-leucina que foi utilizada para cálculo de tais grupos no presente trabalho.



Figura 22 : Curva padrão de L-leucina

Os resultados de absorbância para a curva padrão de L-leucina da Figura 22 são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de absorbância a 345 nm e equação da reta para curva de Lleucina. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3)

Concentração L-Leucina	Absorbância (345 nm)	Equação da reta
(mM)		
0,00	$0,035 \pm 0,002$	
0,25	0,093 ± 0,002	
0,50	0,172 ± 0,001	y = 0,24 x + 0,04
1,00	0,313 ± 0,005	R ² = 0,99
1,25	0,352 ± 0,001	
2,00	0,512 ± 0,002	
2,75	0,681 ± 0,002	
3,00	0,788 ± 0,002	

Legenda: y: absorbância em função da concentração de L-leucina(mM) no meio reacional; x:concentração de L-leucina (mM) no meio reacional; R²: coeficiente de correção da reta

A extensão de reticulação das microesferas reticuladas foi calculada em relação às microesferas não reticuladas.

Os grupos amino livres da gelatina utilizada para obtenção das microesferas também foi determinado conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 : Grupos amino livre (mMol/g) e extensão de reticulação da gelatina e das microesferas de gelatina não reticuladas e reticuladas com GTA ou RUT. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3)

Amostra	Grupos amino livre	Extensão de Reticulação
	(mMol/g)	(%)
Gelatina	2,2 ^a ± 0,0	-
M0	$2,2^{a} \pm 0,0$	-
MG	1,1 ^b ± 0,0	54,4 ± 9,4
MR	2,1 ^a ± 0,5	14,4 ± 7,1

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste ANOVA seguido de Tukey.

M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

O cálculo dos grupos amino livres da gelatina e para as microesferas não reticuladas resultou no mesmo valor. Tal resultado demonstra que o processo de obtenção das microesferas não teve qualquer efeito sobre a reticulação dos grupos amino livres presentes na gelatina.

Em comparação às microesferas de gelatina não reticuladas, o processo de reticulação das microesferas de gelatina com GTA resultou em redução dos grupos amino livres e na extensão de reticulação de 54,4%. Os valores obtidos indicam que os grupos amino livres foram reticulados quando tratados por 4 horas, sob agitação e temperatura ambiente em solução de acetona e NaOH 0,01 M contendo 10 mM (0,1%) de GTA, sugerindo que a reação observada ocorreu mais rapidamente que a descrita por Bigi e colaboradores (2001) que descreveram a reticulação de 60,0 % dos grupos amino livres de filmes de gelatina tratados com tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,05% de GTA por 24 horas em repouso à temperatura ambiente.

O sucesso do GTA como agente reticulante é resultado da presença de várias formas químicas em equilíbrio em determinado pH. Em pHs ≥ 3,0 a reação do GTA com aminoácidos é reversível enquanto em pHs entre 7,0 e 9,0 a reversibilidade é

menor. Em moléculas protéicas, a reticulação com GTA envolve a reação dos grupamentos amino terminais dos resíduos lisil que possuem pKa > 9,5 (Mignealt, 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que uso de meio alcalino no processo de reticulação das microesferas promoveu a interação do GTA com grupos ativos da gelatina, devido, por exemplo, à desprotonação de tais grupos.

Em relação aos valores obtidos para a reticulação com RUT, observa-se que não ocorreu redução nos grupos amino livres. Contudo, os valores de extensão de reticulação sugerem que a reticulação aconteceu de maneira bastante discreta o que também é sugerido pelos resultados obtidos no intumescimento **(Tabela 3).**

Na execução das análises das amostras reticuladas com RUT, observou-se uma grande variação nos valores obtidos para a extensão de reticulação sendo encontrados, além de resultados com valores maiores que zero, resultados negativos e resultados iguais a zero.

Devido a esses achados, foi realizada a leitura do perfil espectral entre 250 nm e 600 nm do meio reacional utilizado para analisar a extensão de reticulação, composto por TNBS 0,01% p/p ; NaHCO₃ 4% p/p; HCl 6 N, contendo as microesferas não reticuladas e as microesferas reticuladas com GTA ou RUT, conforme apresentado na **Figura 23**.



Figura 23 : Perfil espectral do meio para análise da extensão de reticulação

Legenda: Meio para análise da extensão de reticulação: TNBS 0,01% p/p ; NaHCO₃ 4% p/p; HCl 6 N (a): meio contendo microesferas não reticuladas; (b): meio contendo microesferas reticuladas com GTA; (c): meio contendo microesferas reticuladas com RUT; *absorbance*: absorbância; *wavelenght*: comprimento de onda;

No método utilizado no presente trabalho, a leitura do cromóforo formado pela reação do TNBS com os grupos amino livres é realizada em 345 nm. De acordo com os dados do perfil espectral do meio analítico para extensão de reticulação contendo microesferas de gelatina reticuladas com RUT (**Figura 23 c**), observa-se que existe absorção na região de 345 nm. Este comportamento não foi observado para os meios analíticos contendo microesferas de gelatina reticuesferas de gelatina não reticuladas (**Figura 23 a**) ou reticuladas com GTA (**Figura 23 b**).

Tal resultado é compatível com Zuanazzi e Montanha (2004) que descreveram que os espectros característicos dos flavonoides, em geral, ocorrem em 240-285 nm e 300-400 nm, possuindo os flavonóis (classe à qual a rutina pertence) o intervalo de 352-385 nm e indica que o método utilizado não é adequado para a avaliação da extensão de reticulação das microesferas de gelatina reticuladas com RUT.

Em tal contexto, outras técnicas analíticas deveriam ser utilizadas. Uma sugestão seria o emprego da espectrofotometria derivada que consiste na diferenciação do espectro normal por meio de transformação da curva espectral em uma derivada (primeira ou derivadas maiores). Esta técnica geralmente melhora a resolução de bandas, elimina a influência de fundo ou matriz e fornece impressões mais definidas do que o espectro de absorbância comum ou direta uma vez que melhora a detecção de características espectrais menores (KAZEMIPOUR *et al.,* 2002; OJEDA;ROJAS, 2004). Este recurso foi utilizado por Rolim e colaboradores (2006) para quantificar flavonoides (expressos em rutina) em emulsões O/A.

5.5 Área Superficial, volume e tamanho de poro e densidade verdadeira

Devido à mudança de estado físico da gelatina durante a obtenção das microesferas (solubilização em água, seguido por geleificação) os resultados obtidos para essa matéria-prima não foram utilizados para comparação com os resultados obtidos para as microesferas sendo considerados apenas de caráter informativo.

A **Tabela 6** apresenta os resultados para área superficial, volume de poro, tamanho de poro e densidade verdadeira para gelatina, microesferas de gelatina não reticuladas e microesferas de gelatina reticuladas com GTA ou RUT.

Tabela 6 : Resultados da área superficial, volume e tamanho de poro e densidade verdadeira. Os três primeiros resultados foram obtidos em analisador de área superficial sob atmosfera de nitrogênio e o último em picnômetro de gás hélio. Os valores para gelatina referem-se à determinação realizada em um lote e os demais resultados são expressos em média (μ m) ± desvio padrão de três lotes das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT

Amostra	Área Superficial	Tamanho	Volume de poro	Densidade
	(m² g ⁻¹)	de	(x10 ⁻³ cm³/g)	Verdadeira
		poro (nm)		(g/cm³)
Gelatina	0,8	2,6	1,1	1,4
M0	4,4 ^a ± 0,1	3,0 ^a ± 0,1	6,5 ^ª ± 0,1	1,6 ^a ±0,0
MG	1,8 ^b ± 0,4	3,4 ^a ± 0,1	3,4 ^b ± 0,1	1,6 ^a ±0,1
MR	4,1 ^ª ± 1,2	3,0 ^a ± 0,3	5,9 ^a ± 0,1	1,6 ^a ± 0,1

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste ANOVA seguido de Tukey.

M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

A área superficial e o volume de poro das microesferas reticuladas com GTA foram significativamente menores que os valores obtidos para as microesferas não reticuladas e para as microesferas reticuladas com RUT.

Contudo, o volume de poro menor das microesferas reticuladas com GTA não trouxe mudanças na morfologia da superfície das microesferas que pudesse ser identificável nas imagens obtidas por MEV em aumento de 50.000 vezes (Figura 14c, 15c e 16c). Nesse aumento observa-se que a morfologia da superfície das microesferas de gelatina reticuladas com GTA não apresenta diferenças em comparação com as microesferas de gelatina não reticuladas ou com as reticuladas com RUT.

Nas imagens obtidas por microscopia óptica comum (Figura 20) foi possível observar que as partículas reticuladas com GTA não apresentaram alteração de diâmetro em meio aquoso após 1 e 7 dias indicando ausência na absorção de água e no intumescimento. A área superficial e o volume de poro menores podem ser uma explicação para tal comportamento sugerindo que as microesferas de gelatina reticuladas com GTA possuem organização estrutural mais compacta que limita a absorção de água.

O valor de tamanho de poro obtido para todas as amostras encontra-se na faixa de classificação de mesoporosidade (20-500 nm) (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para esse parâmetro entre as microesferas de gelatina não reticuladas e as reticuladas com GTA ou RUT.

Os valores da densidade verdadeira para todas as amostras não apresentaram variações significativas. Tal fato indica que a reticulação com GTA influenciou os resultados de área superficial e volume de poro, porém não teve efeito sobre a densidade verdadeira do pó.

5.6 Distribuição granulométrica e diâmetros das partículas



A distribuição de tamanhos das partículas é apresentada na Figura 21.

Figura 24: Distribuição de tamanho de partículas por meio de dispersão líquida em equipamento de difração de raios laser. (a): gelatina; (b): microesferas de gelatina não reticuladas; (c): microesferas de gelatina reticuladas com GTA; (d) microesferas de gelatina reticuladas com RUT

Do mesmo modo descrito para os valores de área superficial, tamanho de poro, volume de poro e densidade verdadeira, os valores apresentados para distribuição granulométrica e diâmetro para gelatina foram apenas informativos não sendo utilizados para comparação com as microesferas de gelatina.

As microesferas de gelatina reticuladas com GTA ou RUT (Figura 24 c,d) apresentaram faixas granulométricas menores que as microesferas de gelatina não reticuladas (Figura 24 a) e a amplitude de distribuição foi menor nas microesferas de gelatina reticuladas com RUT (Figura 24 d).

Tais resultados indicam que no processo de reticulação ocorre redução do tamanho da partícula o que em parte pode ser atribuído às lavagens com acetona que retiram eventuais resíduos de óleo do processo de obtenção promovendo a desaglomeração das partículas.

Os valores de diâmetros a 10%, 50%, 90% e diâmetro médio da gelatina e das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Diâmetros a 10%, 50%, 90% e diâmetro médio da gelatina e das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT obtidos na análise em equipamento de difração a laser. Os valores são expressos em média (μ m) ± desvio padrão de três réplicas de um lote de gelatina e de três réplicas de dois lotes das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT RUT

Amostra	d (0,1)	d (0,5)	d (0,9)	Diâmetro
				médio
Gelatina	104,5 ± 1,3	350,1 ± 0,1	467,1 ± 0,1	329,1 ± 0,2
M0	1,1 ^a ± 1,0	6,4 ^b ± 1,6	29,4 ^b ± 4,6	11,2 ^b ± 1,9
MG	2,7 ^{a,b} ± 0,3	18,1 ^a ± 2,0	52,1 ^a ± 2,0	23,6 ^ª ± 1,6
MR	4,8 ^b ±1,0	18,4 ^ª ± 0,6	34,7 ^ª ± 3,3	19,7 ^a ± 1,6

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste ANOVA seguido de Tukey.

M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

Os resultados obtidos mostram que os diâmetros médios foram maiores nos grupos submetidos à reticulação. Tais valores são compatíveis com o observado para área superficial **(Tabela 6)** mostrando que o aumento no diâmetro da partícula implica na redução da área superficial.

Contudo, os valores obtidos pela técnica de difração a laser não são compatíveis com os valores obtidos nas técnicas de microscopia óptica comum e MEV.

Ao estudar sistemas emulsionados, Prestes (2012) observou diferença entre os tamanhos das partículas analisadas por tais métodos sendo que os valores obtidos pela técnica de difração a laser foram maiores do que os obtidos que pela técnica de microscopia óptica comum, assim como observado no presente trabalho.

Tais observações corroboram com informação da literatura, que relata que a análise microscópica não pode ser comparada à análise por difração a *laser*, pois a primeira analisa o diâmetro enquanto a segunda analisa o volume da distribuição (KECK, 2010).

5.7 Análise calorimétrica

As propriedades das microesferas de gelatina obtidas no presente estudo foram analisadas por meio de termogravimetria (TG), técnica na qual as alterações de massa da amostra são determinadas em função da temperatura e/ou tempo, e por calorimetria exploratória diferencial (DSC), técnica na qual as mudanças de calor da amostra durante o aquecimento ou resfriamento são acompanhadas em relação a um material de referência inerte (BANNACH *et al.,* 2011).

A curva (a) da **Figura 25** representa os resultados de TG. É possível observar dois principais estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorre até aproximadamente 200,0 °C e pode ser atribuído à perda de água adsorvida e estrutural presente nas amostras. O segundo estágio inicia-se próximo de 250,0 °C e se estende até aproximadamente 400,0 °C e está relacionado à quebra da cadeia protéica (estrutura helicoidal) e ruptura das ligações peptídicas. Tais estágios de perda de massa também foram observados em filmes de gelatina por Barreto e colaboradores (2003).



Figura 25: Análise calorimétrica. (a): Curvas de TG; (b): Curvas de DSC

Legenda: M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

A massa residual de aproximadamente 20,0 % a 600,0 °C se assemelha ao resíduo encontrado para filmes de gelatina por Barreto e colaboradores (2003) e também por Peña e colaboradores (2010).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a perda de massa por TG, conforme apresentado pela **Tabela 8**.

Tabela 8 : Perda de massa em duas faixas de temperatura e massa residual obtidas por TG de gelatina e microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n=3)

Amostra	30°C-200°C	250°C-400°C	30°C-600°C
Gelatina	11,4	59,9	25,5
M0	12,0 ^{°a} ±0,9	63,0 [°] ±2,5	23,3 ^a ±0,6
MG	11,3 ^ª ±0,3	62,1 ^a ±0,8	23,2 ^a ± 2,4
MR	11,9 ^ª ±1,3	62,7 [°] ±2,0	22,7 ^a ± 2,0

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste ANOVA seguido de Tukey.

M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

A curva (b) da **Figura 25** representa os resultados de DSC. O primeiro evento endotérmico observado para a gelatina provavelmente representa sua temperatura de transição vítrea. Em valores inferiores à temperatura de transição vítrea as cadeias poliméricas apresentam pouca mobilidade. Quando o material é aquecido, as cadeias adquirem certo grau de mobilidade e movimento provocando mudança em sua capacidade calorífica (SOUZA; GOULART, 2004). O segundo evento endotérmico pode estar associado à temperatura de fusão das estruturas organizadas. Tais eventos também foram observados por Badii e colaboradores (2005) no estudo do efeito do conteúdo de água sobre as transições de fase da gelatina.

O primeiro evento endotérmico observado para as microesferas de gelatina reticuladas e não reticuladas ocorre como uma discreta mudança da linha de base em temperatura inferior ao observado para a gelatina sugerindo que ocorreu redução na temperatura de transição vítrea para essas amostras. O segundo evento endotérmico também ocorre em temperatura menor sugerindo que ocorreu deslocamento na temperatura de fusão das estruturas organizadas.

O evento endotérmico observado pouco antes de 200,0 °C provavelmente está associado à degradação do polímero.

A reticulação geralmente induz redução na entalpia de denaturação que é atribuída à redução das pontes de hidrogênio, que se quebram endotermicamente, e ao aumento simultâneo na extensão ligações covalentes, que se quebram

exotermicamente (BIGI *et al.*, 2002). Contudo tal comportamento não foi observado nas amostras estudadas.

Pouco antes de 300,0 °C, pode-se observar a ocorrência de um evento exotérmico em todas as amostras estudadas. Aproximadamente a 300,0 °C, nas amostras MG e MR existe um evento endotérmico enquanto que nas amostras de gelatina e de M0 existem dois eventos endotérmicos. Não foram encontrados dados de literatura relatando tais eventos que chamam a atenção por apresentarem comportamentos diferentes entre as amostras reticuladas e as amostras de matéria-prima e microesferas não reticuladas sugerindo que ocorreram alterações estruturais devido à reticulação.

5.8 Dispersões utilizadas para avaliação de aplicabilidade

As dispersões utilizadas para avaliação de aplicabilidade foram preparadas somente com excipientes oleosos a fim de evitar o efeito de intumescimento em meio aquoso das microesferas de gelatina e também para obter compatibilidade e incorporação ótimas dos filtros químicos escolhidos para avaliar a fotoproteção.

Levando-se em consideração a quantidade de RUT utilizada para realizar o processo de reticulação conforme descrito no item **5.1** (0,12 g rutina/g gelatina) e a quantidade de 5,0 % p/p de microesferas adicionadas nas preparações, a quantidade estimada de RUT em cada dispersão foi de 0,6%.

O aspecto das dispersões variou de branco leitoso a tons de amarelo e marrom. Essa variação se deu em função da coloração individual dos materiais utilizados em cada preparação.

As dispersões contendo gelatina (**B**,**G**,**L**,**Q**) apresentaram-se com coloração amarela-clara e textura grosseira provavelmente devido ao tamanho de partícula de observado para a gelatina (**Tabela 7**).

As dispersões contendo microesferas de gelatina não reticuladas (C,H,M,R) apresentaram coloração parecida com a das dispersões contendo gelatina.

O aspecto das dispersões pode ser observado na Figura 26.



Figura 26: Dispersões utilizadas para avaliação de aplicabilidade.

Legenda:

	Α	В	С	D	Е	F	G	Н	I	J	Κ	L	Μ	Ν	0	Ρ	Q	R	S	Т
OM	х	х	х	х	х	х	х	Х	х	х	х	х	х	х	х	х	х	х	Х	х
C®	х	х	х	х	х	х	Х	х	х	х	х	х	х	х	Х	х	х	х	х	х
Gel	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-
M0	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-
MG	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	х	-
MR	-	-	-	-	Х	-	-	-	-	х	-	-	-	-	Х	-	-	-	-	х
BZ3	-	-	-	-	-	х	х	х	х	х	-	-	-	-	-	х	х	х	х	х
OCT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	х	х	х	х	Х	х	Х	х	х	х

A à T: dispersões; OM: Óleo mineral; C[®]: Crodabase[®] SQ; Gel: gelatina; M0: microesferas de gelatina não reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT; BZ3:benzofenona-3; OCT:Octilmetoxicinamato; (x): presença; (-): ausência; As concentrações dos materiais estão descritas na **Tabela 1**.

As dispersões contendo microesferas de gelatina reticuladas com glutaraldeído (**D,I,N,S**) apresentaram coloração amarronzada que foi mais clara nas preparações contendo BZ3 (**I,S**) provavelmente devido à coloração amarelada desta substância, conforme apresentado na **Figura 27**, que pode ter diluído a coloração original da microesfera de gelatina reticulada com GTA (**Figura 10c**).



Figura 27: Fotografia mostrando aspecto de BZ3

As dispersões contendo microesferas de gelatina reticuladas com RUT (**E**,**J**,**O**,**T**) apresentaram coloração amarelada que foi mais clara nas preparações contendo BZ3 (**J**,**T**) provavelmente pelo mesmo motivo anteriormente descrito para as dispersões contendo microesferas de gelatina reticuladas com GTA.

Em relação à textura, todas as dispersões contendo microesferas de gelatina apresentam textura mais suave do que a observada para as dispersões contendo gelatina.

5.9 Atividade fotoprotetora in vitro: FPS e proteção frente à radiação UVA

A espectrofotometria de refletância com esfera de integração foi utilizada para a avaliação da eficácia *in vitro* frente à proteção UVA e UVB das dispersões apresentadas no item **5.8**.

O valor do FPS para as dipersões contendo gelatina (**B**), microesferas não reticuladas (**C**) ou reticuladas (**D**, **E**) foi igual ao da dispersão base (**A**) e teve valor próximo de 1,0, ou seja, ausente de eficácia anti-UVB conforme apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9: Eficácia fotoprotetora *in vitro* de dispersões contendo gelatina, microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT, filtros solares isolados ou combinados. Os valores são expressos em média ± desvio padrão de três amostras um lote de gelatina e de três réplicas de três lotes diferentes das microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT

Dispersão	FPS médio	λ _c (nm) (sem irradiação)	Razão UVA/UVB
Α	1,0 ^a ±0,1	378,6 ^a ± 9,6	0,8 ^a ±0,2
В	1,1 ^a ± 0,2	383,0 ^a ± 10,0	$0,8^{a} \pm 0,3$
С	1,0 ^a ± 0,0	377,5 ^{°a} ± 20,0	0,8 ^a ±0,4
D	1,0 ^a ± 0,0	386,0 ^a ± 6,6	0,8 ^a ±0,3
E	1,0 ^a ± 0,0	374,6 ^a ± 12,4	0,6 ^a ±0,2
F	2,8 ^b ± 0,3	354,7 ^b ± 1,2	0,5 ^b ± 0,0
G	4,1 ^c ± 0,5	354,5 ^b ± 1,9	0,5 ^b ± 0,0
н	$3,7^{b,c} \pm 0,3$	356,1 ^b ± 1,7	0,5 ^b ± 0,0
1	$3,3^{b,c} \pm 0,3$	354,9 ^b ± 0,5	0,5 ^b ± 0,0
J	$3,8^{b,c} \pm 0,5$	356,3 ^b ± 0,7	0,5 ^b ± 0,0
κ	$6,4^{d} \pm 0,4$	328,3 ^d ± 2,2	$0,1^{d} \pm 0,0$
L	8,4 ^e ± 1,0	327,3 ^d ± 2,9	0,1 ^d ± 0,0
Μ	$6.8^{d,e} \pm 0.6$	328,7 ^d ± 3,4	$0,1^{d} \pm 0,0$
Ν	$7,7^{d,e} \pm 0,3$	327,6 ^d ± 2,1	$0,1^{d} \pm 0,0$
0	$7,3^{d,e} \pm 0,8$	328,0 ^d ± 3,7	0,1 ^d ± 0,0
Р	10,1 ^f ± 4,1	351,3 ^f ± 1,7	0,3 ^f ±0,0
Q	16,2 ^f ± 3,4	350,0 ^f ± 1,1	0,3 ^f ±0,0
R	10,7 ^f ± 1,1	350,7 ^f ± 0,2	0,3 ^f ±0,0
S	11,0 ^f ± 2,1	351,2 ^f ± 1,2	0,3 ^f ±0,0
т	12,4 ^f ± 1,4	350,9 ^f ± 0,9	$0,4^{f} \pm 0,0$

Legenda: FPS: Fator de proteção solar; λ_C : comprimento de onda crítico

Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste ANOVA seguido de Tukey.

As proporções (% p/p) utilizadas de BZ3 e OCT nas dispersões para avaliação de aplicabilidade representaram a concentração máxima permitida pelo FDA (ESTADOS UNIDOS, 2012), que é de 6,0% e 7,5%, respectivamente. Para as microesferas, foi utilizada 5,0 % que representa 1/5 da quantidade máxima permitida para filtros físicos (dióxido de titânio e óxido de zinco) que é de 25,0 %.

Segundo o FDA, é permitida a combinação dos filtros químicos e físicos filtros selecionados neste estudo desde que a concentração máxima seja respeitada e que o FPS do produto final seja maior do que o número de filtros utilizados multiplicado por 2. Deste modo, para as dispersões contendo OCT ou BZ3 e gelatina ou microesferas o FPS mínimo seria de 4,0 e para as dispersões contendo OCT, BZ3 e microesferas o FPS mínimo seria de 6,0.

Todas as dispersões contendo OCT e gelatina ou microesferas atenderam o requisito e apresentaram valores de FPS iguais ou superiores a 4,0 (gelatina, dispersão L: FPS = 8,4 ± 1,0; microesferas não reticuladas, dispersão M: FPS = 6,8 ± 0,6; microesferas reticuladas com GTA, dispersão N: FPS = 7,7 ± 0,3; microesferas reticuladas com RUT, dispersão O: FPS = 7,3 ± 0,8). Porém, nas dispersões contendo BZ3 e gelatina ou microesferas, tal requisito foi atendido somente pela dispersão contendo gelatina (dispersão G: FPS = 4,1 ± 0,5).

Do mesmo modo, todas as dispersões contendo OCT, BZ3 e gelatina ou microesferas atenderam o requisito e apresentaram valores de FPS iguais ou superiores a 6,0 (gelatina, dispersão **Q**: 16,2 ± 3,4; microesferas não reticuladas, dispersão **R**: FPS = 10,7 ± 1,1; microesferas reticuladas com GTA, dispersão **S**: FPS = 11,0 ± 2,1; microesferas reticuladas com RUT, dispersão **T**: FPS = 12,4 ± 1,4).

As dispersões contendo gelatina e BZ3 ou OCT (dispersões G e L), apresentaram valores de FPS estatisticamente maiores que os das dispersões contendo esses filtros isoladamente (dispersões F e K) sugerindo que a gelatina na condição de matéria-prima quando combinada com os filtros apresenta absorção na região do UVB.

De acordo com a legislação vigente no Brasil para proteção solar (BRASIL, 2012b), segundo a designação de categoria de proteção (DCP), as dispersões contendo OCT isolado ou combinado com BZ3 poderiam ser classificadas como "baixa proteção" por apresentarem FPS entre 6,0 e 14,9. Somente a dispersão contendo OCT, BZ3 e gelatina poderia ser classificada como "média proteção" por apresentar FPS entre 15,0 e 29,9.

Em relação ao λ_c , somente os resultados obtidos para as dispersões sem filtros (dispersões **A**,**B**,**C**,**D** e E) apresentaram valores de λ_c superiores a 370 nm, sugerindo ação de amplo espectro. Contudo, os valores de FPS médio são de aproximadamente 1,0 indicando baixa proteção frente à radiação UVB.

5. Resultados e Discussão

A razão UVA/UVB das dispersões contendo OCT (dispersões K, L, M, N e O) foi a menor entre todas as dispersões e pode ser explicada pela ação UVB que é atribuída a este filtro químico.

As Figuras 28, 29, 30 e 31 apresentam os gráficos de absorbância em função do comprimento de onda das dispersões sem filtros (Figura 28), com BZ3 (Figura 29), com OCT (Figura 30) e com BZ3 e OCT (Figura 31).



Figura 28: Perfil espectral das dispersões sem filtro solar e com Gel, M0, MG ou MR (dispersões A,B,C,D,E)

Legenda: BZ3: benzofenona-3; Gel:gelatina;M0:microesferas de gelatina não-reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT



Figura 29: Perfil espectral das dispersões contendo BZ3 isolada ou combinada com Gel, M0, MG ou MR (dispersões **F,G,H,I,J**) **Legenda:** Bz3: benzofenona-3; Gel:gelatina;M0:microesferas de gelatina não-reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT



Figura 30: Perfil espectral das dispersões contendo OCT isolado ou combinado com Gel, M0, MG ou MR (dispersões K,L,M,N,O) Legenda: Oct: octilmetoxicinamato; Gel:gelatina; M0:microesferas de gelatina não-reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT



Figura 31: Perfil espectral das dispersões contendo BZ3 e OCT isolados ou combinados com Gel, M0, MG ou MR (dispersões **P,Q,R,S,T**)

Legenda: BZ3: benzofenona-3; OCT: octilmetoxicinamato; Gel:gelatina; M0:microesferas de gelatina não-reticuladas; MG: microesferas de gelatina reticuladas com GTA; MR: microesferas de gelatina reticuladas com RUT

5. Resultados e Discussão

As misturas sem filtros não apresentaram absorbância (Figura 28), indicando que a gelatina e as micropartículas isoladas não possuem ação fotoprotetora.

Nas misturas contendo BZ3 e/ou OCT (Figuras 29, 30 e 31) observa-se que não ocorreram deslocamentos ou mudanças nos perfis dos picos em função da presença da gelatina ou das micropartículas não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. Considerações Finais

O desenvolvimento do método quantitativo para mensurar os agentes reticulantes presentes no meio de reticulação e nos meios de lavagem das microesferas, após o término da reação de reticulação, não fez parte do escopo deste trabalho, contudo, seria um importante indicador da interação dos agentes reticulantes com as microesferas de gelatina.

A avaliação da extensão de reticulação por meio da observação microscópica do intumescimento foi um método simples, porém mostrou-se de difícil execução e reprodutibilidade. Demais métodos descritos para filmes ou géis de gelatina poderiam ser avaliados e, posteriormente, otimizados, como alternativa.

A quantificação da extensão de reticulação por meio da medição espectrofotométrica do derivado formado da reação com o TNBS foi eficaz quando o agente reticulante foi o GTA, mas não quando o agente reticulante foi a RUT. Deste modo, outra técnica analítica, tal como a espectrofotometria derivada, poderia ser opção de método analítico para quantificar tal reação.

O efeito dos agentes reticulantes sobre as microefereas poderia ser estudado com variações de processo, tais como a concentração dos agentes reticulantes e o tempo de reação de reticulação. Além disso, as microesferas de gelatina poderiam ser estudadas como meios de incorporação de filtros químicos, visando reduzir efeito alergênico e fotodegradação destes, no entanto, mantendo o efeito fotoprotetor.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos e em função das condições experimentais adotadas, tem-se por conclusões:

- A obtenção de microesferas de gelatina, utilizando o método por polimerização em emulsão e extração com solvente, resultou em substância na forma de pó fino composto por partículas esféricas e com ampla distribuição granulométrica.
- O uso do meio de reticulação combinado de acetona e NaOH 0,01 M, por quatro horas em temperatura ambiente (20°C a 25°C), resultou em pó fino e fluido, com menor amplitude de distribuição granulométrica em relação às microesferas não reticuladas.
- O estudo das propriedades físico-químicas das microesferas não reticuladas e reticuladas com GTA ou com RUT indicou que o método de reticulação foi mais eficaz quando o agente reticulante foi o GTA e sugeriu que a reticulação com RUT ocorreu, no entanto, em extensão inferior.
- O estudo da aplicabilidade em dispersões oleosas contendo microesferas de gelatina não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT isoladas ou combinadas com filtros químicos, já amplamente estudados e descritos para proteção UVA e/ou proteção UVB, sugeriu que as microesferas, na concentração de 5,0% p/p não reticuladas ou reticuladas com GTA ou RUT, não apresentaram efeito fotoprotetor clássico (efeito químico ou físico), quando isoladas, e não apresentaram efeito sinérgico quando associadas aos filtros solares.

8. REFERÊNCIAS

8. Referências

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **J. Agric. Food Chem**. Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Eds.), **Flavonoids-Chemistry, Biochemistry and Applications**, CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006.

AURAND, E.R; LAMPE,K.J.; BJUGSTAD, K.B. Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering, **Neuroscience Research**, v.72, p. 199–213, 2012.

BABEL, W. *et al.* Gelatin. In: **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.** Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, v. 16, p. 579-591.

BADII, F.; MACNAUGHTAN, W.; FARHAT, I.A. Enthalpy relaxation of gelatin in the glassy state. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 263-269, 2005.

BALOGH, T.S.; VELASCO, M.V.R.; PEDRIALI, C.A.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras Dermatol**., v.86, n.4, p.732-42,2011.

BANNACH, G.; PERPÉTUO, G.L.; CAVALHEIRO, E.T.G.; CAVALHEIRO,C.C.S.; ROCHA,R.R. Efeito da história térmica das propriedades do polímero PET: um experimento para ensino de análise térmica. **Quim. Nova**, v. 34, n.10, p.1825-1829, 2011.

BARRETO, P.L.M.; PIRES, A.T.T; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polym. Degrad. Stabil**. v.79, p.147-152, 2003.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. ; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking, **Biomaterials**, London, v.22, p.763-768, 2001.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin, **Biomaterials**, London, v.23, p.4827-4832, 2002.

BLOOM, O. T. (1925). US PATENT 1.540.979.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 211 de 14 de julho de 2005, Ficam estabelecidas a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 29 de 01 de junho de 2012, Aprova o regulamento técnico MERCOSUL sobre "Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes" e dá outras providências, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 30 de 01 de junho de 2012, Aprova o regulamento técnico MERCOSUL sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012b.

BRESOLIN, T.M.B.; RODRIGUES, C.A.; ANDREAZZA, I.F.; LUCINDA, R.M.; ANDREAZZA, R.C.S.; FREITAS, R.A.; MOURÃO, S.C. Sistemas de Liberação de Fármacos. In: BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C. (Org.). Ciências farmacêuticas contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, 2003, p.183-184.

BRUN-GRAEPPI, A.K.A.S.; CYRILLE, R.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; MERTEN, O-W. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers, **J. Controlled Release**, v.149, p.209–224, 2011.

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia, Zaragoza, Acribia, 1991.

BRYANT, S.J.; ANSETH, K.S., Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. J. Biomed. Mater. Res. v.59, p. 63–72, 2002.

BULCKE, A. I. V. D.; BOGDANOV, B.; DE ROOZE, N.; SCHACHT, E. H. ; CORNELISSEN, M.; BERGHMANS, H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels, **Biomacromolecules**, v.1, p.31-38, 2000.

CAI, W.; GUPTA, R.B. Hydrogels In: JOHN WILEY & SONS, Inc. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, New Jersey: John Wiley & Sons. v. 13, 5^a ed., 2005, p. 729-759.

CAMPOS, E.; BRANQUINHO, J.; CARREIRA, A.S.; CARVALHO, A.; COIMBRA, P.; FERREIA, P.; GIL, M.H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, n.49, p.2005–202, 2013.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., W.A.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, **J. Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.84, p. 21–27, 2006.

CATALINA, M.; ATTENBURROW, G.E.; COT, J., COVINGTON, A.D., ANTUNES, A.P.M. Influence of crosslinkers and crosslinking nethod on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste. **J. Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2105-2011, 2010.

CHENG, F.; CHOY, Y.B.; CHOI, H.; KIM, K. Modeling of small-molecule release from crosslinked hydrogel microspheres: Effect of crosslinking and enzymatic degradation of hydrogel matrix. **Int. J. Pharm.** v.403, p. 90–95, 2011.

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an *in vitro* method. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1117-1118, 2008.

CHOY, Y.B.; CHENG, F.; CHOI, H.; KIM, K. Monodisperse Gelatin Microspheres as a Drug Delivery Vehicle: Release Profile and Effect of Crosslinking Density. **Macromol. Biosci**. v.8, p.758–765, 2008.

COESTER, C.J.; LANGER, K.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation – a new preparation method, surface modifications and cell uptake, **J. Microencapsulation**, London, v.17, p.187-193, 2000.

COLIPA – THE EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION. In vitro method for the determination of the UVA protection factor and "critical wavelength" values of sunscreen products, 2009, 22p.

DINARVAND, R.; RAHMANI, E.; FARBOUD, E. Gelatin microsprehes for the controlled release of all-trans-retinoic acid topical formulation and drug delivery evaluation. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 47-50, 2003.

DINARVAND, R.; MAHMOOD, S.; FARBOUD, E.; SALEHI, M.; ATYABI, F. Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid – Effect of cross-linking in drug release, **Acta Pharm**., v.55, p.57-67, 2005.

DJABOUROV, M.; LECHAIRE, J.; GAILL, F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. **Biorheology**, London, v.30 (3-4), p.191-205. 1993.

DUGAS, A.J; CASTAÑEDA-COSTA, J.; BONIN, G.C; PRIVE K.L; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **J. Natural Products**, v.63, p. 327-331, 2000.

EPSTEIN, J. H. Biological efect of sunlight. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M.A. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect.** New York: Marcel Dekker, 1990. p. 43-54.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. **Biomaterials**, London, v. 20, 2009-20, 1995.

ESTADOS UNIDOS. Code of Federal Regulations Title 21 Food and Drugs. Chapter I Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter D – Drugs for Human use Part 352. **Sunscreen drug products for over-the- counter human use.** Subpart C- Labeling Sec. 352.50 Principal display panel of all sunscreen drug products. v.5, 2012.

FILHO, D.W.; SILVA, E.L.; BOVERIS A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob as óticas da química medicinal moderna.** São Paulo: Argos Editora Universitária. 2001, p. 317.

FLOR, J. ; DAVOLOS, M. R.; CORREIA, M. A. Protetores solares. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FORNI, F.; VANDELLI, M.A.; CAMERONI, R. Influence of drug loading level on drug release and dynamic swelling of crosslinked gelatin microspheres. **J.Microesncapsulation**, v.9, n. 1, p.29-39, 1992.

FRANZ, J.; POKOROVÁ, D.;HAMPL, J.; DITTRICH, M. Adjuvant efficacy of gelatin particles and microparticles. International Journal of Pharmaceutics, v.168, p. 153–161, 1998.

GAN, C.-Y.;CHENG, L. –H.; EASA, A.M. Assessment of Cross-Linking in Combined Cross-Linked Soy Protein Isolate Gels by Microbial Transglutaminase and Maillard Reaction . **Journal of food science**, v.74 n.2, C141-C146, 2009.

GILLEO, K. Advances in packaging and assembly polymers, **Microelectronics International**, v.13, n. 3, p.19 – 22, 1996.

GILSENAN, P.M.; ROSS-MURPHY, S.B. Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.29, p. 53–61, 2001.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D.; ULMO, N.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, M.P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, London, v.16, n.1, p. 25-34, 2002.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ - CABALLERO, E.;GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for the development of active biodegradable films. **Trends in Food Science and Technology**, London, v.20, p. 3-16, 2009

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, London, 2011.

GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; de ABREU, F.C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C.; LIMA, L. M.; GIANELLA NETO, D. ; SUSTOVICH, C.; LOPES, N. P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HABBEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenenesulfonic acid. **Analytical Biochemistry**. v.14, p.328-336, 1966.

HABBEB, A.F.S.A.; HIRAMOTO, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. Arch. Biochem. Biophys. v.126, p.16-26, 1968.

HANSON, K.M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C.J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, p.1205-1212, 2006.

HARBONE, J.B.; WILLIANS, C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p 481-504, 2000.

HAUG, I.J.; DRAGET, K.I. Gelatin. In: Phillips, G.O.; Williams, P.A. (eds.). **Handbook of hydrocolloids,** Cap.6, Boca Raton, Boston, New York, Washington, DC: CRC Press, 2009, p.147-148.

HAYASHI, K., TABATA, Y. Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions, **Acta Biomaterialia**, n.7, p.2797–2803, 2011.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002

HERMANSON, G.T. Bioconjugate techniques. 2.ed. London: Academic, 2008. 1202p

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses ans drug delivery matrices. **Biomaterials.** Great Britain,v.17, p.471-484, 1996.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. In: HARRIS, P. (Ed.). Food gels. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1990, p. 233-289.

KARIM, A.A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids.** v.23, p.563–576, 2009.

KASPER, F.K.; KUSHIBIKI, T.; KIMURA, Y.; MIKOS, A.G.; TABATA, Y. *In vivo* release of plasmid DNA from composites of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate) and cationizedgelatin microspheres. **Journal of Controlled Release**, v.107, p.547-561, 2005.

KAZEMIPOUR, M.; NOROOZIAN, E.; TEHRANI, M.S.; MAHMOUDIAN, M. A new secondderivative spectrophotometric method for determination of permetrin in shampoo. J. Pharm. Biomed. Anal. v.30, p.1379–1384, 2002.

KECK, C.M. Sizing methods for nanocarriers. In: WORKSHOP NANOTECNOLOGIA, 1, São Paulo, 2010. **Apostila**. p.6.

KONG, Y.-Q; LI, D.; WANG, L.-J.; ADHIKARI, B. SLOV Preparation of gelatin microparticles using water-in-water (w/w) emulsification technique. **Journal of Food Engineering** v.103, p.9-13, 2011.

KOSLOV, P.V.; BURDYGINA, G.I. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. **Polymers** v.24, p. 651-666-2389, 1983.

KOSARAJU, S.L.; PUVANENTHIRAN, A.; LILLFORD, P. Naturally crosslinked gelatin gels with modified material properties. **Food Research International**, v.43, p. 2385-2389, 2010.

KULLAVANIIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. Naturally crosslinked gelatin gels with modified material properties. **J.Am.Acad.Dermatol.**, v.52, p. 937-958, 2005.

LIANG, H.-C.; CHANG, W.-H.; LIN, K.-J.; SUNG, H.-W. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: *In vitro* and *in vivo* studies. **J. Biomed. Mater. Res.** v.65A, p.271-281, 2003.

LIN, C.C., ANSETH, K.S., PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. **Pharm. Res.**, v. 26, p. 631–643, 2009.

MENDONÇA, V.L.M. **Protetores solares de alta proteção: estabilidade física e eficácia.** São Paulo, 1998. 145 p. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, **BioTechniques**, v.37, p. 790-802, 2004.

MOHOS, F. Á. Gelling, emulsifying, stabilizing and foam formation. **Confectionery and Chocolate Engineering: Principles and Applications.** Willey-Blackwell, 2010, p.416-421.

NAGAI, N.; YUNOKI,S.; SUZUKI,T.; SAKATA, M.; TAJIMA,K.; MUNEKATA.M. Application of Cross-Linked Salmon Atelocollagen to the Scaffold of Human Periodontal Ligament Cell. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 389–394, 2004.

NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N.K. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B–loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v.** 4, p. 252–261, 2008.

NIMNI, M.E; CHEUNG, D.T.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Bioprothesis derived from cross-linked and chemically modified collagenous tissues. In: Nimni ME, editor. **Collagen**, v.3, Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 1-38.

OJEDA, C.B.;ROJAS, F.S.. Recent developments in derivative ultraviolet/visible spectrophotometry. **Anal. Chim. Acta** v.518, p.1-24, 2004.

PATEL, M.; JAIN, S.K.; YADAV, A.K.; GOGNA, D.; AGRAWAL, G.P. Preparation and Characterization of Oxybenzone-Loaded Gelatin Microspheres for Enhancement of Sunscreening Efficacy. **Drug delivery**, v. 13, p.323-330, 2006.

PEÑA, C.; CABA, K.; ECEIZA; A.; RUSECKAITE, R.; MONDRAGON, I. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource Technology**, v.101, p 6836–6842, 2010.

PENG, Z.; LI, Z.; SHEN, Y. Influence of Chemical Cross-Linking on Properties of Gelatin/Chitosan Microspheres. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, Philadelphia, v. 51, n. 4, p.381-385, 2012.

PRESTES, P., S. Tomografia por coerência óptica (OCT) reologia, análise térmica e tamanho de partículas aplicados na caracterização de sistemas emulsionados de orientação de uso cosmético. São Paulo, 2012. 92 p. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

QUIDEAU,S.; DEFFIEUX,D.; DOUAT-CASASSUS,C.; POUYSÉGU,L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, **Angewandte Chemie International Edition**, v.50, p. 586-621, 2011.

RABANEL, J.-M.; BANQUY, X.; ZOUAOUI, H.; MOKHTAR, M. ; HILDGEN, P. Progress technology in microencapsulation methods for cell therapy, **Biotechnol. Prog.**, v. 25, p.946–963, 2009.

RATANAVARAPORN, J.; RANGKUPAN, R.; JEERATAWATCHAI, H.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.47, p.431–438, 2010.

ROLIM, A.; OISHI, T.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants, **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, p.107–11438, 2006.

ROSS-MURPHY, S.B. Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. **Polymer**. v.33, n.12, 2622-2627-, 1992.

SAMBANDAN, D.R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update, J. Am. Acad. Dermatol., v.64:p.748-758, 2011.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHLUMP, F. M. *et al.*. Endocrineactivity and development toxicity cosmetic UV filters – an update. **Toxicology**, Amsterdam, v. 205, n. 1/2, p. 113-122, 2004.

SHEU, M.,-T.; HUANG, J.-C.; YEH, G, -C.; HO, H.-O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. **Biomaterials**, v.22, p 1713-1719, 2001.

SOUZA, P.P.; SILVA, G.G.; AMARAL, L.O.F. O cotidiano é meio amorfo: transição vítrea uma abordagem para o ensino médio. **Química nova na escola,** n.20, p. 21-25, 2004.

SPRINGSTEEN, A.; YUREK, R.; FRAZIER, M.; CARR, K. F. *In vitro* measurement of sunprotection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Anal. Chim. Acta**, USA, v.380, n. 2-3, p. 155-164, 1999.

STAINSBY, G. Gelatin gels. In: PEARSON , A. M.; DUTSON, T. R. ; BAILEY, A. J. (Eds.), Advances in meat research, collagen as a food, v.4. New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc., 1987, p. 209-222.

STRAUSS, G.; GIBSON, S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatinbased coacervates for use as food ingredients, **Food Hydrocolloids**, v.18, p.81-89, 2004.

TABATA,Y.; IKADA,Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p.287-301, 1998.

TANAKA, N.; SETSUKO, T.; UTSUMI, I. A new oral gelatinized sustained-release dosage form. **J.Ph.Sciences**. v.52, n.7, p.664-667, 1963.

TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Quim. Nova,** v.. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.
UGWOKE, M.I.; KINGET, R. Influence of processing variables on the properties of gelatin microspheres prepared by the emulsification solvent extraction technique. **J.Microencapsulation**, v.15, n.3, p.273-281, 1998.

VANDELLI, M.A.; RIVASI, F.; GUERRA, P.; FORNI, F.; ARLETTI, R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potencial drug delivery system: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. **Int. J. Pharm.**, v.215, p.175-184, 2001.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S.O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da rutina com *p*-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora por espectroscopia de refletância. Lat. Am. J. Pharm., Buenos Aires, v. 27, n.1, p.23-27, 2008.

VEIS, A. The macromolecular chemistry of gelatin. New York, London: Academic Press, 1964.

VICENTINI, F.T.; FONSECA, Y.M.; PITOL, D.L.; IYOMASA, M.M.; BENTLEY, M.V.; FONSECA, M.J. Evaluation of protective effect of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin against UVB-induced damage in hairless mice skin. **J.Pharm.Sci.**, v.13, n.2, p.275-85, 2010.

WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER K, Desolvation process and surface characterization of protein nanoparticles. **Int.J. Phar.** v.194, 91-102, 2000.

WEI, H.-J.; YANG, H.,-H.; CHEN; C.-H.; LIN, W.-W.; CHEN, S.-C.;LAI, P.-H.; CHANG, Y.; SUNG, H.-W. Gelatin microspheres encapsulated with a nonpeptide angiogenic agent, ginsenoside Rg1, for intramyocardial injection in a rat model with infarcted myocardium, **Journal of Controlled Release**, v.120, p.27-34, 2007.

XIAO, W.; HE, J.; NICHOL, J.W.; WANG, L.; HUTSON, C.B.; WANGA, B.; DUA,Y.; FAN, H.; KHADEMHOSSEINI, A. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels, **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 2384–2393, 2011.

YAO, C.,-H.; LIU , B.,-S.; CHANG, C.,-J.; HSUB, S.,-H.; CHEN, Y.,-S. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials, **Materials Chemistry and Physics**, v.83, p.204–208, 2004.

YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, v.109, p.256–274, 2005.

ZEIGER, E.; GOLLAPUDI, B.; SPENCER, P. Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde – a review. **Mutation Research**, v.589. p.36-151, 2005.

ZHAI, W.; LÜ, X.; CHANG, J.; ZHOU, Y.; ZHANG, H. Quercetin-crosslinked porcine heart valve matrix: Mechanical properties, stability, anticalcification and cytocompatibility. **Acta Biomaterialia**, v.6, p.389–395, 2010.

ZHANG, W.J.; BJÖRN, L.O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants, **Fitoterapia**, n.80, p.207–218, 2009.

ZWIOREK K.; KLOECKNER J.; WAGNER E.; COESTER,C. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, Alberta. v.7, p.22-28, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. cap.23, p.577-614.