



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
PARA A DETERMINAÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS DE  
FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS E USO DA  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X PARA A DETERMINAÇÃO  
DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR**

**LIVIA MANIERO PERUCHI**

**ORIENTADORA: PROFa. Dra. SUSANNE RATH**

CAMPINAS/SP  
AGOSTO DE 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

P435d Peruchi, Livia Maniero.  
Desenvolvimento de método cromatográfico para a  
determinação de ingredientes ativos de formulações  
fotoprotetoras e uso da fluorescência de raios-X para a  
determinação do fator de proteção solar / Livia Maniero  
Peruchi. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientadora: Susanne Rath.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Filtro solar. 2. HPLC. 3. FPS. I. Rath, Susanne.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Química. III. Título.

**Título em inglês:** Development of chromatographic method for the determination of active ingredients in sunscreen formulations and use of X-ray fluorescence to determine the sun protection factor

**Palavras-chaves em inglês:** Sunscreen, HPLC, SPF

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Suzanne Rath (orientadora), Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP), Isarita Martins (UNIFAL)

**Data de defesa:** 02/08/2010



*Aos meus pais, Celso e Ligia, dos quais tanto me orgulho e a minha irmã Natalia. Por amá-los tanto e como gratidão por todo apoio e incentivo, dedico este trabalho.*



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Profa. Dra. Susanne Rath pela oportunidade e por todo ensinamento e amizade dedicados ao longo desses dois anos.

À Profa. Dra Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (Bell) e sua aluna Juliana Terra por terem me recebido tão bem em seu laboratório, e que foram de extrema importância na realização desse trabalho.

Ao professor Félix Guillermo Reyes Reyes e ao grupo GTAF, por terem me recebido e pela paciência e ensinamentos.

Aos amigos que fiz na UNICAMP: Cyntia (Dálite), Ricardo, Leonardo, Keity, Laís, Isarita, Fernando, Jonas e Rafael Porto pela amizade, convivência, momentos de descontração e por toda ajuda e palavras de incentivo quando precisei.

Aos amigos de laboratório: Amanda, Adriana, Caio, César, Gabriela, Kelly, Leandro, Letícia, Martins, Rafael Medeiros e Sandra pela ótima convivência.

À minha “amiga-irmã” Milena que me fez compreender o significado da palavra *amizade*. Por tanto me ajudar, me ouvir e estar do meu lado em todos os momentos.

À Larissa, amiga do coração fiel e confidente, pela amizade, carinho e por me apoiar sempre.

Ao Rene, pelo amor, amizade, apoio e incentivo no final desse trabalho.

Às amigas Kátia e Raquel pelos momentos inesquecíveis e que, mesmo de longe, acompanham minha vida e estão sempre na torcida.

A toda direção e aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP pelo apoio acadêmico e técnico.

À CAPES pelo apoio financeiro.



## CURRICULUM VITAE

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9304364990113208>

### 1. **Formação Acadêmica**

---

- 2008-2010      Mestrado em Química Analítica. IQ/UNICAMP, Brasil.  
Título: Desenvolvimento de método cromatográfico para a determinação de ingredientes ativos de formulações fotoprotetoras e uso da fluorescência de raios-X para a determinação do fator de proteção solar  
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath  
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2001-2004      Graduação em Bacharelado em Química. USP - São Carlos, Brasil.

### 2. **Produção Científica**

---

#### 2.1. **Iniciação científica**

Título: Estudo da solubilização e derivatização de celulose obtidas de diversas fontes.  
Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos.  
Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Elisabete Frollini  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico

#### 2.2. **Apresentação de trabalhos em eventos científicos**

PERUCHI, Livia M., RATH, Susanne. Development and application of an HPLC method for nine sunscreen agents in suncare products. In: 35<sup>o</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2010. Boston, EUA.

PERUCHI, Livia M., RATH, Susanne. Influência da temperatura na separação cromatográfica de ingredientes ativos de protetores solares. In: 33<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

PERUCHI, Livia M., RATH, Susanne. Quantificação de compostos ativos em formulações fotoprotetoras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: 33<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

PERUCHI, Livia M.; RATH, Susanne. Estudo e otimização das condições cromatográficas para determinação de compostos ativos de protetores solares por HPLC. In: 15<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica e 3<sup>o</sup> Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador-BA.

PERUCHI, Livia M.; CANAES, Larissa S.; RATH, Susanne. Determinação simultânea de ingredientes ativos de protetores solares utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Apresentação oral. In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador-BA

MORGADO, Daniella L.; PERUCHI, Livia M.; ASS, Beatriz A. P. et al. Celulose de linter: acetilação em meio homogêneo usando DMAc/LiCl – DMSO/TBAF.3H<sub>2</sub>O como sistemas de solvente. In: 8. Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Águas de Lindóia. Proceedings do 8. Congresso Brasileiro de Polímeros. São Carlos: Associação Brasileira de Polímeros, 2005: pag 1193-1195.

PERUCHI, Livia M., MORGADO, Daniella L. Estudo da solubilização e derivatização da celulose de linter usando como sistemas de solvente dimetilsulfóxido/fluoreto de tetrabutylamônio tri-hidratado e dimetilacetamida/cloreto de lítio. In: 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP), 2004, São Paulo, SP

PERUCHI, Livia M., MORGADO, Daniella L. Estudo da solubilização e derivatização da celulose de linter usando como sistemas de solvente dimetilsulfóxido/fluoreto de tetrabutylamônio tri-hidratado e dimetilacetamida/cloreto de lítio. In: Simpósio de Iniciação Científica PET (SICPET), 2004, USP, São Carlos, SP.

PERUCHI, Livia M., MORGADO, Daniella L. Estudo da solubilização e derivatização de celulose de linter no sistema de solvente dimetilacetamida/cloreto de lítio. In: 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP), 2003, São Carlos, SP.

### **3. Monitorias**

---

08/2009 – Programa de Estágio Docente (PED C), DQA/IQ/UNICAMP.  
12/2009 Química II – QA 213 (Engenharia de Alimentos) (Coordenadora: Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno)

### **4. Experiência Profissional**

---

Plante Certo Ltda – Laboratório de análise química e física de solos, fertilizantes, tecido vegetal, corretivos agrícolas, alimentos (nutrição animal) e água.

Cargo: Responsável técnica

Atividades: Monitoramento e gerenciamento das atividades laboratoriais, desenvolvimento e implantação de novas metodologias de análise, controle de qualidade (certificado com conceito máximo de qualidade por programas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ, USP e Embrapa-solos, Rio de Janeiro).

Período: 10/2005 – 07/2008

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA A DETERMINAÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS E USO DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X PARA A DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de oito compostos ativos amplamente utilizados em protetores solares: benzofenona-3, octocrileno, metil benzilideno cânfora, octil dimetil PABA, metoxicinamato de etilexila, butil metoxidibenzoilmetano, homosalato (usado nas suas duas formas isoméricas) e salicilato de etilexila. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna cromatográfica ACE C18 (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), na temperatura de 20 °C e fase móvel composta por metanol:água 88:12 v/v com eluição isocrática. A vazão foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e a quantificação foi feita por padronização externa no comprimento de onda máximo de cada composto. O tempo da corrida cromatográfica foi de 18 minutos. O preparo de amostra consistiu basicamente de diluição e filtração anterior quantificação. Os parâmetros considerados na validação do método foram: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão intra e inter-ensaio e exatidão.

O método foi aplicado em treze amostras de diferentes fabricantes disponíveis comercialmente. O número de compostos ativos variaram entre 1 e 5 em uma mesma amostra. As concentrações dos compostos estão na faixa de 0,9-10% (m/m) e estão de acordo com o limite máximo permitido pela ANVISA.

Este trabalho teve também como objetivo avaliar a potencialidade do uso de fluorescência de raios-X para determinar o FPS (fator de proteção solar) de protetores solares utilizando métodos quimiométricos. Para isso foram selecionadas várias amostras de um mesmo fabricante com diferentes FPS. Os espectros de raios-X obtidos foram tratados com a ferramenta quimiométrica PCA (*Principal Component Analysis*) para a análise exploratória dos dados e então construiu-se um modelo de calibração por PLS (*Partial Least Squares*).



## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN SUNSCREEN FORMULATIONS AND USE OF X-RAY FLUORESCENCE TO DETERMINE THE SUN PROTECTION FACTOR**

This work describes the development and validation of a HPLC-DAD method for determination of eight sunscreen agents: benzophenone-3, octocrylene, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, homosalate (used in two isomeric forms), butyl metoxydibenzoylmethane, 4-methylbenzylidene camphor and octyl dimethyl PABA in sunscreen formulations. The separation of the eight compounds were achieved using a ACE C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), column temperature 20 °C, and a mobile phase of 88:12 (v/v) methanol-water with isocratic elution. The flow rate was 1 mL/min and quantitation was performed by external calibration at the maximum wavelength of each compound. Total run time was 18 minutes. The sample preparation was simple and consisted basically of dilution and filtration before quantitation. The critical points of the method are the column temperature, composition of the C18 stationary phase and the composition of the mobile phase. The validation parameters comprised: linear range, linearity, selectivity, intra-day and inter-day precision, and accuracy, and were in accordance with the aim of the method.

Thirteen samples of sunscreen emulsions (SPF 30) of different manufacturer were analyzed. The number of the sunscreen agents varied between one and five in a same sample. The concentrations of all compounds were in the range of 0.9 to 10% (m/m) and were in accordance with the current Brazilian legislation.

This work has also evaluated the potential of use of X-ray fluorescence to determine the SPF (sun protection factor) of sunscreens using chemometric methods. For this purpose, several samples from the same manufacturer (same components) with different FPS were selected. The X-ray spectra obtained were treated with a chemiometric tool PCA (Principal Component Analysis) for exploratory data analysis and then built a calibration model by PLS (Partial Least Squares).



# ÍNDICE GERAL

<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
CURRICULUM VITAE	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
<b><u>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</u></b>	<b>1</b>
<b>I.1 A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS</b>	<b>3</b>
<b>I.2 SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV</b>	<b>5</b>
<b>I.3 FILTROS SOLARES</b>	<b>7</b>
<b>I.3.1 FILTROS FÍSICOS OU INORGÂNICOS</b>	<b>8</b>
<b>I.3.2 FILTROS QUÍMICOS OU ORGÂNICOS</b>	<b>9</b>
<b>I.4 PROTETORES SOLARES</b>	<b>15</b>
<b>I.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FILTROS SOLARES</b>	<b>17</b>
<b>I.6 FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)</b>	<b>22</b>
<b>I.7 DETERMINAÇÃO DO FPS</b>	<b>26</b>
<b><u>CAPÍTULO II - OBJETIVOS</u></b>	<b>29</b>

<b><u>CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL</u></b>	33
<b>III.1 REAGENTES E SOLUÇÕES</b>	35
<b>III.1.1 SOLUÇÕES ESTOQUE</b>	36
<b>III.1.2 SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO</b>	36
<b>III.2 EQUIPAMENTOS</b>	36
<b>III.3 PROCEDIMENTOS</b>	37
<b>III.3.1 TESTES DAS FASES ESTACIONÁRIAS</b>	37
<b>III.3.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA</b>	40
<b>III.3.3 OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA</b>	40
<b>III.3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b>	41
<b>III.3.4.1 LINEARIDADE, FAIXA DE APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE</b>	42
<b>III.3.4.2 PRECISÃO</b>	42
<b>III.3.4.3 EXATIDÃO</b>	43
<b>III.3.4.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS MEDIANTE MÉTODO POR ADIÇÃO DE PADRÃO</b>	45
<b>III.3.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS</b>	46
<b>III.3.6 DETERMINAÇÃO DO FPS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X</b>	47
<b><u>CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	49
<b>IV.1 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS</b>	51
<b>IV.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA</b>	58

<b>IV.3</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA</b>	<b>63</b>
<b>IV.4</b>	<b>VALIDAÇÃO</b>	<b>65</b>
<b>IV.4.1</b>	<b>LINEARIDADE, FAIXA DE APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE</b>	<b>65</b>
<b>IV.4.2</b>	<b>PRECISÃO</b>	<b>70</b>
<b>IV.4.3</b>	<b>EXATIDÃO</b>	<b>72</b>
<b>IV.5</b>	<b>ANÁLISE DE AMOSTRAS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE</b>	<b>75</b>
<b>IV.6</b>	<b>DETERMINAÇÃO DO FPS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X</b>	<b>85</b>
	<b><u>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES</u></b>	<b>95</b>
	<b><u>CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>99</b>



# LISTA DE TABELAS

<b>Nº</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
<b>III.1</b>	Tipos de eluições e fases móveis avaliadas para as fases estacionárias	39
<b>III.2</b>	Quantidade de padrão adicionado na amostra baseado nos resultados de precisão inter-ensaio (50 %)	44
<b>III.3</b>	Quantidade de padrão adicionado em cada ponto da curva por adição de padrão	45
<b>III.4</b>	Origem e ingredientes ativos presentes nas amostras analisadas	47
<b>IV.1</b>	Valores de $R_s$ , $A_s$ e $N$ para a fase estacionária ACE C18, utilizando fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v	56
<b>IV.2</b>	Tempos de retenção ( $t_R$ ) (em minutos) e resolução ( $R_S$ ) dos filtros solares. Coluna: ACE C18, fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> e temperaturas da coluna de 20, 30, 33, 35, 37, 40, 45 e 50° C	61
<b>IV.3</b>	Condições de preparo de amostras e resultados médios obtidos (n= 2) para as amostras	64
<b>IV.4</b>	Parâmetros da curva analítica	70
<b>IV.5</b>	Resultados da precisão intra e inter-ensaio	72
<b>IV.6</b>	Resultados de recuperação e as estimativas dos desvios padrão relativos	74
<b>IV.7</b>	Resultados da porcentagem de OCT na amostra calculados pela curva de adição de padrão	75
<b>IV.8</b>	Resultados médios dos princípios ativos e estimativas do	82

desvio padrão relativo das amostras analisadas

<b>IV.9</b>	Concentração máxima dos filtros solares permitida em formulações fotoprotetoras comercializadas no Brasil	84
<b>IV.10</b>	Valores VP, VR e erros relativos do modelo de calibração interna via PLS	92
<b>IV.11</b>	Valores VR, VP e ER das amostras externas	93

# LISTA DE FIGURAS

Nº	Descrição	Página
I.1	Espectro da radiação solar (SVOBODOVA <i>et al.</i> , 2006)	3
I.2	Estrutura da pele e profundidade de penetração das radiações UVA, UVB e UVC (adaptado de <a href="http://www.revistavivasaude.uol.com.br">www.revistavivasaude.uol.com.br</a> )	4
I.3	Estrutura molecular do trans e cis-ácido urocânico (UCA) (YOUNG, 1996)	7
I.4	Diagramas dos orbitais moleculares (a) do benzeno (b) do benzeno quando é adicionado um grupo doador de elétrons ao anel e (c) do benzeno quando é adicionado um grupo receptor de elétrons ao anel (FLOR <i>et al.</i> , 2007)	14
I.5	Relação não-linear entre a porcentagem de radiação UV bloqueada e o FPS de formulações fotoprotetoras	25
III.1	Fluxograma do preparo de amostra	41
IV.1	Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração de 10 µg mL <sup>-1</sup> . Coluna analítica X-Bridge™ C18, fase móvel composta de MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15, v/v, volume de injeção de 50 µL, vazão de 1 mL min <sup>-1</sup> e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm	53
IV.2	Cromatograma Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração 10 µg mL <sup>-1</sup> . Coluna analítica X-Terra® RP18, fase móvel composta de MeOH:H <sub>2</sub> O 85:15, v/v, volume	54

de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm

- IV.3** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15, v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm 55
- IV.4** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12, v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de absorção de cada composto 56
- IV.5a** Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, ODP, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) nas temperaturas de 20, 30, 33, 35<sup>o</sup> C, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Comprimento de onda de detecção: máximo de absorção de cada composto 59
- IV.5b** Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) nas temperaturas de 37, 40, 45 e 50 ° C, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Comprimento de onda de 60

	detecção: máximo de absorção de cada composto	
<b>IV.6</b>	Gráfico do tempo de retenção em função da temperatura para os compostos BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL. Coluna: ACE C18, fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup>	62
<b>IV.7a</b>	Curvas analíticas dos compostos BZ3, MCE e MBC na faixa de concentração de 0 a 40 µg mL <sup>-1</sup> e os respectivos gráficos de resíduos	67
<b>IV.7b</b>	Curvas analíticas dos compostos BMDM, OCT, HMS na faixa de concentração de 0 a 40 µg mL <sup>-1</sup> e os respectivos gráficos de resíduos	68
<b>IV.7c</b>	Curvas analíticas dos compostos PABA e SCL na faixa de concentração de 0 a 40 µg mL <sup>-1</sup> e os respectivos gráficos de resíduos	69
<b>IV.8a</b>	Cromatogramas obtidos para as amostras A, B e C. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto	76
<b>IV.8b</b>	Cromatogramas obtidos para as amostras D, E e F. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto	77
<b>IV.8c</b>	Cromatogramas obtidos para as amostras G, H e I. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção:	78

	máximo de cada composto	
<b>IV.8d</b>	Cromatogramas obtidos para as amostras J, L e M. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto	79
<b>IV.8e</b>	Cromatogramas obtidos para a amostra N. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto	80
<b>IV.9</b>	Estrutura dos isômeros cis e trans do composto homosalato	81
<b>IV.10</b>	Gráfico de concentração dos filtros solares em função do FPS para as amostras A e B	85
<b>IV.11</b>	Espectro de raios X da amostra B com FPS 20	87
<b>IV.12</b>	Gráfico de scores para o conjunto de amostras obtido para PC1 x PC2	88
<b>IV.13</b>	Loadings para o conjunto de amostras obtido para PC1	88
<b>IV.14</b>	Relação gráfica para cada amostra entre o resíduo Student e leverage considerando todas as amostras e 3 variáveis latentes	90
<b>IV.15</b>	Relação entre os valores VR e VP para o modelo de calibração interna via PLS	91

---

---

# I. INTRODUÇÃO

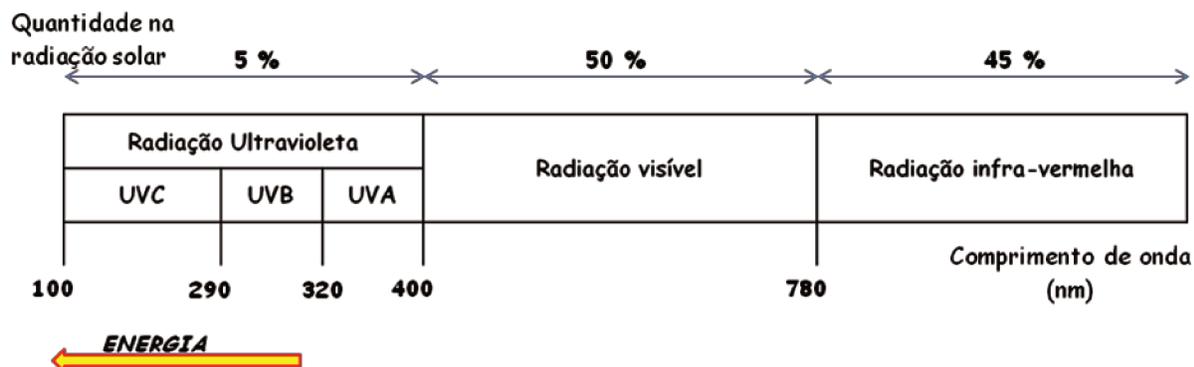
---

---



## I.1. A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS

A luz solar que atinge a superfície terrestre é constituída de um espectro contínuo de radiação eletromagnética que pode ser dividido em três regiões principais de acordo com a faixa de comprimento de onda: a radiação ultravioleta ou radiação UV (100-400 nm) que constitui 5 % da luz solar, a radiação visível (400-780 nm) que constitui 50 % da luz solar e a radiação infravermelha (acima de 780 nm) que constitui 45 % da luz solar. De acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (*International Commission on Illumination*, CIE), a radiação UV é subdividida em três categorias dependendo da região de comprimento de onda: UVA, também chamada de UV próximo, onda longa ou ainda “*blacklight*” (320-400 nm), UVB, também chamado de onda média (290-320 nm) e UVC, também chamada de onda curta (100-280) (Figura I.1) (SVOBODOVA *et al.*, 2006).

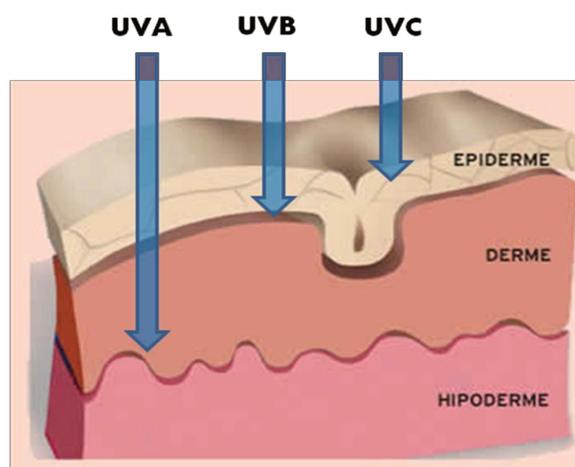


**Figura I.1.** Espectro da radiação solar (SVOBODOVA *et al.*, 2006).

Diversos são os efeitos da radiação ultravioleta na saúde humana. Um dos efeitos benéficos dessa radiação é a síntese da vitamina D<sub>3</sub>. A radiação UVB converte fotoquimicamente o 7-deidrocolesterol presente na epiderme em vitamina D<sub>3</sub> numa reação controlada pela temperatura da pele que demora de dois a três dias para se completar. Curtas exposições ao sol (aproximadamente 15 minutos) são suficientes para sintetizar a vitamina D<sub>3</sub> na pele (DIFFEY, 1998; GRUIJL, 1998). A

radiação UV também tem sido usada como um agente terapêutico para várias doenças de pele, como no tratamento de icterícia (cor amarela da pele e do branco dos olhos de bebês causada pelo excesso de bilirrubina no sangue), psoríase, micoses, vitiligo e dermatites atópicas (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004; GALLAGHER & LEE, 2006). No entanto, os efeitos maléficos dessa radiação no organismo humano são de maior impacto e relevância.

A radiação UVA possui menos energia que as radiações UVB e UVC, mas é a que penetra mais profundamente na pele (Figura I.2), sendo absorvida principalmente pela melanina e hemoglobina. É a principal responsável pela pigmentação da pele promovendo o bronzeamento por meio do escurecimento da melanina pela fotoxidação da leucomelanina, localizada nas células das camadas externas da epiderme. A radiação UVA causa danos às proteínas estruturais da derme, como o colágeno e elastina, provocando a perda da elasticidade e o envelhecimento precoce. Além disso, induz a diminuição de artérias e pode provocar câncer de pele, dependendo do tipo de pele e do tempo, frequência e intensidade da exposição (FLOR *et al.*, 2007; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ & MÜLLER-GOYMANN, 2006; LONNI *et al.*, 2008; GRANGER & BROWN, 2001, PALM & O'DONOGHUE, 2007).



**Figura I.2.** Estrutura da pele e profundidade de penetração das radiações UVA, UVB e UVC (adaptado de [www.revistavivasaude.uol.com.br](http://www.revistavivasaude.uol.com.br)).

A radiação UVB é a responsável pela produção de eritema (queimadura solar), que é a mais visível e bem reconhecida resposta cutânea aguda à radiação UV, especialmente em indivíduos de pele clara. As moléculas responsáveis pela absorção da luz (cromóforos) que iniciam a inflamação eritematosa não são precisamente conhecidas. No entanto, o espectro de ação do eritema é consistente com a hipótese de que a radiação UV interage com o DNA, provocando danos que podem ser irreversíveis (MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004). A radiação UVB está fortemente ligada à mutações genéticas e ao câncer de pele. Além disso, a UVB causa efeitos imunossupressores locais e sistêmicos, que provoca a redução da capacidade do organismo de reconhecer antígenos tumorais ou virais (BRENNER & HEARING, 2008).

A radiação UVB também é responsável por outros distúrbios como catarata, dermatoses por fotossensibilidade como erupção polimorfa à luz e melanomas (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ & MÜLLER-GOYMANN, 2006).

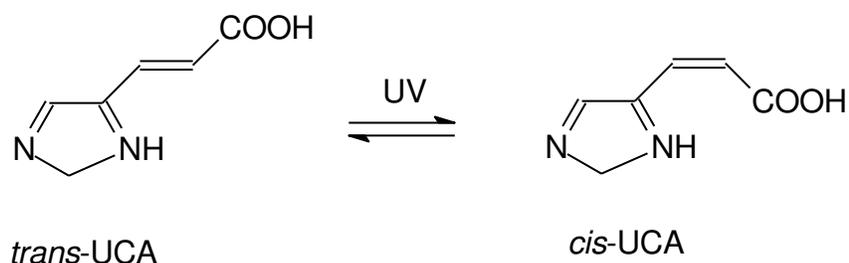
A radiação UVC é a radiação UV de maior energia sendo reconhecida por suas propriedades germicidas. Ela é extremamente nociva aos seres vivos por ser eritematosa, mutagênica e cancerígena. É absorvida pela camada de ozônio e outros gases da atmosfera, que também filtram parte da radiação UVB, e praticamente não chega a atingir a superfície terrestre. Por esse motivo, a destruição da camada de ozônio é um assunto tão relevante, já que essa destruição causa um aumento dos níveis de raios UV incidentes, principalmente UVB e UVC. Estima-se que a diminuição de 1% dos níveis de ozônio da atmosfera resulta em um aumento de 1-2% de mortalidade por câncer de pele (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

## **I.2. SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV**

A pele constitui uma considerável proteção contra a penetração de raios ultravioletas.

A reação mais visível da exposição à radiação UV é a formação de melanina, um mecanismo natural de defesa que tenta diminuir a penetração da radiação solar na pele (NOLE & JOHNSON, 2004; URBACH, 1997). A melanina age como um filtro da pele e absorve radiações UVB, UVA, visível e infravermelha, ajudando a transformar essas energias em calor e dispersando-o entre os pelos do corpo e artérias (SVOBODOVA *et al.*, 2006). Ela provoca a pigmentação da pele e cabelos, sendo responsável também pelo chamado bronzeamento. A pigmentação da pele provocada pela melanina é de dois tipos: 1) constitutiva – provoca a cor da pele observada em diferentes raças e é determinada apenas por fatores genéticos e 2) facultativa – provoca o aumento do bronzeamento em resposta à radiação UV solar; esse efeito é reversível (DIFFEY, 1998).

Outro composto que atua no sistema de defesa do corpo humano contra a radiação UV é o ácido urocânico (UCA), que é um intermediário do catabolismo da L-histidina. Ele é encontrado naturalmente no suor da pele e na camada córnea (camada mais superficial da epiderme) na forma de seu isômero *trans* (Figura 3) e é o maior absorvedor de UV da pele. Com a radiação UV, o *trans*-UCA isomeriza para *cis*-UCA até o estado estacionário ser atingido, que é quando quantidades aproximadamente iguais dos dois isômeros estão presentes. São necessárias cerca de duas semanas até o *trans*-UCA voltar ao seu nível de concentração original. A isomerização é eficiente em comprimentos de onda entre 290 e 341 nm (UVA e UVB) e tem seu máximo de eficiência entre 290 e 310 nm. Existe uma grande variação de concentração de UCA entre indivíduos, mas uma pequena variação entre as partes do corpo de um mesmo indivíduo. Não há correlação entre essa concentração e o tipo de pele, grau de pigmentação ou espessura da camada córnea (DUTHIE *et al.*, 1998).



**Figura I.3.** Estrutura molecular do *trans* e *cis*-ácido urocânico (UCA) (YOUNG, 1996).

### **I.3. FILTROS SOLARES**

Filtros solares são compostos químicos adicionados às formulações cosméticas e tem a função de absorver, espalhar e/ou refletir a radiação UV solar, reduzindo assim, a dose de radiação nociva na pele (NASH & TANNER, 2006).

A preocupação do ser humano em se proteger do sol existe desde os primeiros tempos. Sabe-se que os povos antigos (gregos e egípcios) utilizavam roupas de algodão e tinham o costume de utilizar chapéus, luvas e até mesmo sombrinhas. Os povos como os tibetanos cobriam o corpo com uma combinação de ervas que hoje pode ser considerada como filtro solar (MILESI & GUTERRES, 2002).

A história dos filtros solares modernos começou durante a II Guerra Mundial, quando houve a necessidade de proteção contra queimaduras solares dos soldados americanos que lutavam em países tropicais. Embora as preparações desenvolvidas pelas forças americanas fossem para uso exclusivo dos soldados, elas acabaram se popularizando e foram utilizadas por muitos anos. As preparações continham ésteres de ácido para-aminobenzóico (PABA) e para-dimetilaminobenzóico. O PABA era utilizado como filtro solar desde 1920, mas sua esterificação com alcoóis alifáticos de cadeias longas resultou em compostos insolúveis em água e não facilmente removido da pele pelo suor, água ou atrito (WOLF *et al.*, 2001).

Nos anos 80, com o avanço das pesquisas em torno dos efeitos danosos provocados pela radiação solar, bem como de sua proteção, vários outros compostos filtros solares foram introduzidos no mercado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2006 a Resolução RDC nº 47 que estabelece a lista de filtros solares permitidos em cosméticos e suas concentrações máximas permitidas no Brasil (ANVISA, 2006).

Os filtros solares são classificados como filtros de efeito físico (filtros físicos ou inorgânicos) e filtros de efeito químico (filtros químicos ou orgânicos). Geralmente os filtros físicos agem refletindo e espalhando a radiação, enquanto que os filtros químicos protegem a pele pela absorção da radiação (WOLF *et al.*, 2001; PALM & O'DONOGHUE, 2007; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007; DE ORSI *et al.*, 2006; SALVADOR & CHISVERT, 2005; SERPONE *et al.*, 2007; MELQUIADES *et al.*, 2008a; MELQUIADES *et al.*, 2008b; LONNI *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007; VILLALOBOS-HERNÁNDEZ & MÜLLER-GOYMAN, 2006).

### **I.3.1. FILTROS FÍSICOS OU INORGÂNICOS**

Geralmente são utilizados como filtros físicos compostos minerais como os óxidos de zinco e titânio (ZnO e TiO<sub>2</sub>). A característica requerida para um filtro inorgânico é bloquear a luz UV na faixa UVA/UVB por meio de propriedades de absorção, espalhamento e reflexão da radiação que são determinadas pelo índice refrativo, tamanho das partículas, dispersão na emulsão base e pela espessura do filme aplicado sobre a pele (SERPONE *et al.*, 2007).

Reportado como agente filtro solar desde 1952, esse tipo de filtro foi um dos primeiros a serem utilizados principalmente por aqueles que se expunham muito tempo ao sol. No entanto, seu uso era limitado devido à sua aparência opaca e visualmente desagradável (filme branco sobre a pele) e sua incompatibilidade com as formulações cosméticas (SERPONE *et al.*, 2007).

No início dos anos 90, quando surgiram óxidos de zinco e titânio microfinos, esse tipo de filtro ganhou maior aceitabilidade no mercado e tornou-se muito popular. As partículas que tinham tamanho de 150-400 nm puderam ser produzidas em tamanhos de 20-150 nm, minimizando a interação das partículas com a luz visível (espalhamento da luz visível) e proporcionando uma aparência transparente na pele (WOLF *et al.*, 2001).

Com relação aos mecanismos de ação dos filtros físicos é importante enfatizar que, em contraste com as versões opacas (de partículas maiores) que espalham e refletem a radiação em uma grande faixa de comprimento de onda, as versões microfinas e ultrafinas atenuam a radiação por meio de uma combinação de espalhamento e absorção da radiação (WOLF *et al.*, 2001; BARON & STEVENS, 2002). Essa absorção é baseada na característica semicondutora desses óxidos, que permite a mobilização de elétrons excitados pela radiação UV da banda de valência para a banda de condução do sólido. O dióxido de titânio absorve principalmente a radiação UVB e o óxido de zinco, a radiação UVA (VILLALOBOS-HERNÁNDEZ & MÜLLER-GOYMAN, 2006).

Os filtros físicos representam a forma mais segura e eficaz para proteger a pele, pois apresentam baixo potencial alergênico, sendo inclusive, recomendados no preparo de fotoprotetores para uso infantil e para indivíduos com peles sensíveis. No entanto, essas micropartículas tendem a se aglomerar e se agregar nas emulsões devido aos efeitos eletrostáticos, resultando em perda do desempenho final do produto. Para diminuir esses efeitos, as partículas devem ser recobertas para ficarem dispersas no veículo, o que tem sido um dos maiores desafios da indústria cosmética (FLOR *et al.*, 2007; LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007).

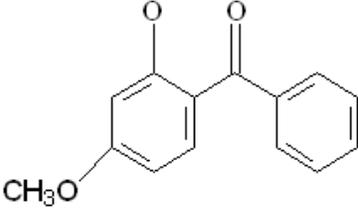
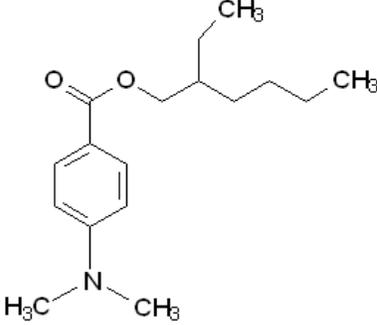
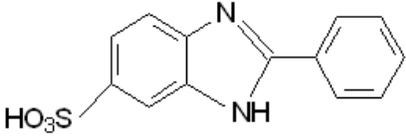
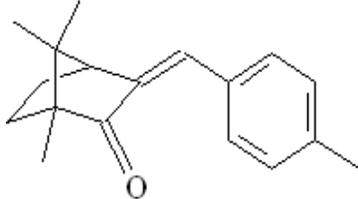
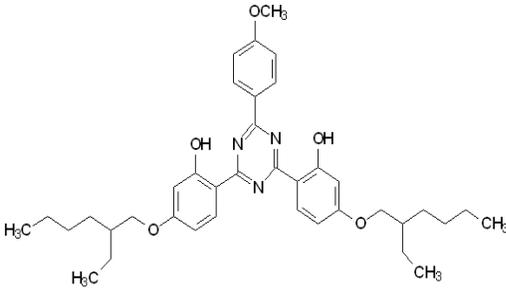
### **I.3.2. FILTROS QUÍMICOS OU ORGÂNICOS**

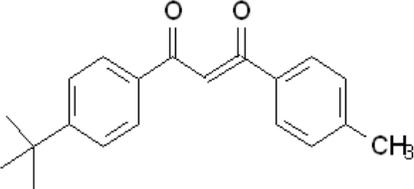
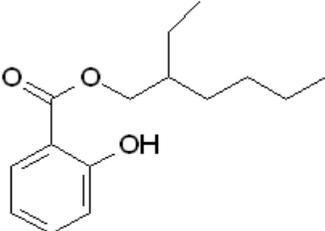
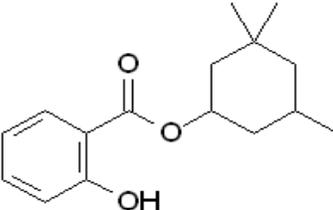
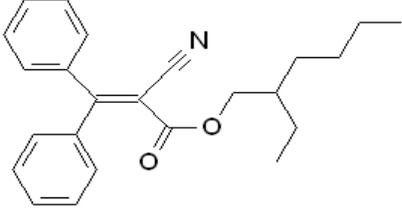
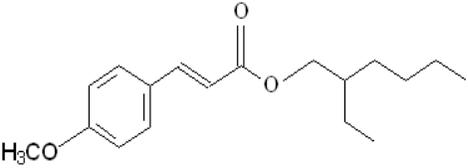
Filtros químicos ou orgânicos são geralmente compostos aromáticos

conjugados com um grupo doador de elétrons na posição “orto” ou “para” a um grupo receptor de elétrons. Essa estrutura química favorece a delocalização de elétrons e, com isso, a excitação da molécula do estado fundamental para um estado de maior energia. Cálculos quânticos mostram que a energia necessária para essa transição de estados corresponde à energia da radiação UV nas regiões UVA e UVB. Quando a molécula retorna ao seu estado fundamental, é emitida energia de menor magnitude, por exemplo, na região do infravermelho na forma de calor (WOLF *et al.*, 2001, KIMBROUGH, 1997).

As estruturas dos compostos normalmente utilizados como filtros orgânicos em produtos cosméticos, seus nomes (de acordo com a ANVISA), nomes INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) e comprimentos de onda onde ocorrem os máximos de absorção estão listados no Quadro I.1.

**Quadro I.1.** Compostos filtros orgânicos mais usados em cosméticos.

Nome do composto*	Nome INCI inglês (português)	Estrutura	Absorção Máxima
2-Hidroxi-4-Metoxibenzofenona	BENZOPHENONE-3 (BENZOFENONA-3) (BZ3)		288 nm
4-Dimetil-aminobenzoato de 2-etilexila	OCTYL (ou ETHYLHEXYL) DIMETHYL PABA (OCTIL DIMETIL PABA) (PABA)		313 nm
Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico	PHENYLBENZYLIMIDAZOL SULFONIC ACID (ÁCIDO FENILBENZIMIDAZOL SULFÔNICO) (AFS)		304 nm
3-(4-Metilbenzilideno cânfora	4-METHYL BENZYLIDENE CAMPHOR (4-METIL BENZILIDENO CÂNFORA) (MBC)		303 nm
(1,3,5)-Triazina-2,4-bis[[4-(2-etil-hexiloxi)-2-hidroxi]-fenil]-6-(4-metoxifenil	ANISOTRIAZINE (ANISOTRIAZINA)		310 nm

Nome do composto*	Nome INCI inglês (português)	Estrutura	Absorção Máxima
1-(4-Terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona	BUTYL METHOXY DIBENZOIL METHANE (BUTIL METOXI DIBENZOIL METANO) (BMDM)		359 nm
Salicilato de 2-etilexila	OCTYL (ou ETHYLHEXYL) SALICYLATE (SALICILATO DE OCTILA) (SCL)		237 nm
Salicilato de Homomentila	HOMOSALATE (HOMOSALATO) (HMS)		238 nm
2-Ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilexila	OCTOCRYLENE (OCTOCRILENO) (OCT)		305 nm
4-Metoxicinamato de 2-etilexila	OCTYL (ou ETHYLHEXYL) METHOXYCINNAMATE (METOXYCINAMATO DE OCTILA) (MCE)		310 nm

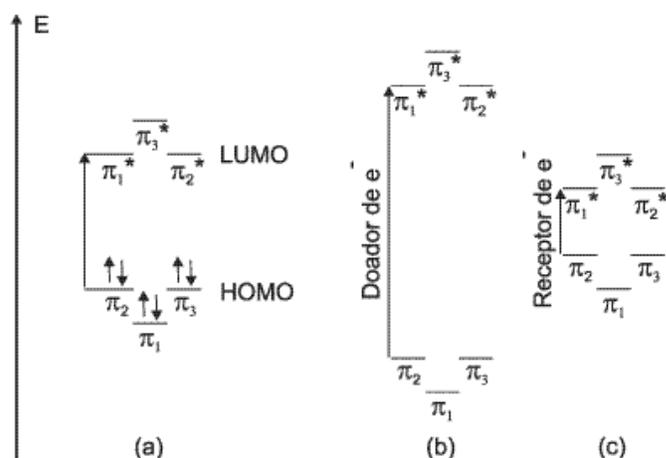
\*De acordo com a ANVISA.

Observa-se no Quadro I.1 que os comprimentos de onda onde ocorrem os máximos de absorção dos compostos apresentam uma grande variação. Isso pode ser explicado de maneira simplificada pela Teoria dos Orbitais Moleculares (TOM). O processo de absorção da radiação UV pelas moléculas filtros envolve transições eletrônicas do orbital molecular preenchido de maior energia (HOMO) para o orbital molecular vazio de menor energia (LUMO) (HUHEEY *et al.*, 1993; FLOR *et al.*, 2007).

Quando um grupo doador de elétrons é inserido no anel aromático, aumenta-se a possibilidade de ressonância e, conseqüentemente, a estabilidade do anel. Sendo mais estável, a energia dos orbitais ligantes diminui e a dos antiligantes aumenta, elevando a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Assim, para excitar os elétrons e levar a molécula do estado fundamental para um estado de energia mais alta, é necessária uma radiação mais energética, isto é, com menores comprimentos de onda.

O contrário ocorre quando é adicionado ao anel aromático um grupo receptor de elétrons. Esse grupo receptor irá desestabilizar o sistema aromático e, com isso, aumentar a energia do orbital ligante e diminuir a energia do orbital antiligante, reduzindo a diferença entre os orbitais HOMO e LUMO. Para excitar a molécula, nesse caso, é necessária uma radiação de baixa energia, ou seja, com maiores comprimentos de onda (HUHEEY *et al.*, 1993; FLOR *et al.*, 2007).

A Figura I.4 ilustra de forma simplificada os orbitais moleculares do benzeno quando são adicionados grupos doadores e receptores de elétrons.



**Figura I.4.** Diagramas dos orbitais moleculares (a) do benzeno (b) do benzeno quando é adicionado um grupo doador de elétrons ao anel e (c) do benzeno quando é adicionado um grupo receptor de elétrons ao anel (FLOR *et al.*, 2007).

Considerando as estruturas dos filtros, pode-se observar que na estrutura do octil dimetil PABA (PABA) estão presentes o grupo doador de elétrons  $(\text{CH}_3)_2\text{N}$  e o grupo receptor de elétrons COOR. Já no butil metoxidibenzoilmetano (BMDM) há apenas o grupo receptor de elétrons  $\text{COCH}_2\text{COHC}_6\text{H}_6$ . De acordo com a TOM, o filtro BMDM está com anel aromático mais desestabilizado e a diferença de energia entre HOMO e LUMO é menor quando comparado ao PABA. Como consequência, o comprimento de onda onde o BMDM tem sua máxima absorção é em 359 nm, enquanto que o PABA em 313 nm.

Para conseguir uma proteção em uma ampla faixa do espectro da radiação UV, as indústrias cosméticas normalmente utilizam uma combinação de compostos filtros UV que absorvem a radiação em diferentes regiões do espectro.

Idealmente os compostos filtros UV devem ser fotoquimicamente estáveis na luz do sol, dissolver ou dispersar fácil e permanentemente no veículo, permanecer na pele após transpiração ou contato com água, ser atóxico e não causar irritação ou alergia de

contato. No entanto, os filtros orgânicos apresentam maior potencial alergênico e de causar irritações da pele quando comparados aos filtros inorgânicos. Além disso, foi verificada a presença de filtros orgânicos na urina de indivíduos expostos às formulações, comprovando a absorção desses pela pele (SALVADOR, 2005). Os efeitos desses compostos no organismo ainda não são bem conhecidos. Há na literatura estudos que sugerem que alguns desses compostos sejam nocivos ao sistema endócrino, afetando a produção de hormônios principalmente em mulheres (CALAFAT *et al.*, 2008; SEIDLOVÁ-WUTTKE *et al.*, 2006).

#### **I.4. PROTETORES SOLARES**

Para disponibilizar os filtros solares ao consumidor é necessário que os mesmos estejam incorporados a um veículo. Esta associação filtro solar/veículo denomina-se protetor solar ou fotoprotetor.

A formulação de um fotoprotetor exige a observação de vários componentes, que são indispensáveis para a obtenção de um produto ideal, ou seja, seguro, resistente à água, estável e econômico. O tipo de filtro solar (ingrediente ativo) é apenas um desses componentes, sendo a fotoproteção também influenciada pelo veículo escolhido e seus componentes, bem como pela espessura e uniformidade do filme formado sobre a pele (MILESI & GUTERRES, 2002).

Diversos são os veículos possíveis de serem utilizados no preparo de protetores solares, envolvendo desde simples soluções até sistemas mais complexos como emulsões. Os principais veículos empregados em formulações fotoprotetoras são:

*a) Produtos baseados em óleos (óleos, batons, géis oleosos, sprays oleosos)*

Esse tipo de protetor é relativamente fácil de preparar, pois a maioria das substâncias ativas é óleo ou sólido cristalino solúvel em óleo. Normalmente são

adicionados espessantes como ceras, particulados como sílica e argila e polímeros solúveis em óleos, que tornam o produto mais viscoso (TANNER, 2006).

Embora esse tipo de fotoprotetor seja o mais fácil de preparar, ele não é tão popular devido à sensação desagradável na pele e seu alto custo. Geralmente esse tipo de veículo é empregado para formular protetores solares com baixos fatores de proteção, devido à sua baixa capacidade de formar filme sobre a pele.

*b) Produtos baseados em água (géis aquosos)*

É o tipo menos disponível comercialmente, devido ao limitado número de filtros hidrossolúveis e também à sua pobre resistência à água e transpiração. Seu preparo também é relativamente fácil; combina água com o filtro solúvel e um espessante como um polímero hidrossolúvel (TANNER, 2006).

*c) Produtos baseados em álcool/óleo (géis, sprays)*

Esse tipo de produto agrega vantagens dos produtos baseados em água e em óleo, pois diferentemente da água, o álcool dissolve praticamente todos os filtros, além de ser volátil e minimizar os resíduos do produto na pele. Adicionalmente, esses produtos apresentam a vantagem de serem transparentes, secarem rapidamente após a aplicação e proporcionar sensação de refrescância.

As principais desvantagens dos produtos baseados em álcool/óleo são o maior potencial de ressecamento da pele, além da dificuldade de aplicação causada pela rápida evaporação do produto, podendo resultar em filmes com diferentes espessuras na pele (TANNER, 2006).

*d) Produtos baseados em emulsões (cremes, loções, sprays mousses)*

É o tipo mais comum de protetores solares, sendo disponibilizados nas formas óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). Devido ao fato de a água ser um dos principais componentes, a sensação na pele é mais agradável e seu custo é reduzido. Além disso, por ter a fase oleosa, incorpora praticamente todos os tipos de filtros, inclusive os inorgânicos e também outros ingredientes como emolientes, hidratantes, agentes antiidade, entre outros.

Para manter a loção fotoprotetora estável e evitar a separação das fases, são adicionados emulsificantes à formulação, além de outros componentes como emolientes, que atuam sobre a espalhabilidade e a penetração na pele e formadores de filmes, que garantem a hidrorresistência na pele (TANNER, 2006).

No Brasil os protetores solares são considerados cosméticos (ANVISA), diferentemente dos Estados Unidos da América, onde o FDA (*Food and Drug Administration*) considera esses produtos como “OTC” (*over the counter*, uma denominação utilizada para medicamentos de venda livre) desde 25 de agosto de 1978, quando publicou no Federal Register um aviso antecipado de proposta de regulamentação (ANPR) quando utilizados em seres humanos (RUVOLO JUNIOR, 1997), já que são considerados como produtos para prevenção de efeitos agudos (como o eritema solar) e crônicos (como o câncer de pele) causados pela radiação solar (FDA, 1999).

### **I.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FILTROS SOLARES**

Devido ao grande número de filtros solares permitidos e a complexidade da formulação em que eles estão incorporados, o desenvolvimento de um método que quantifique as concentrações de agentes filtros se tornou muito importante. As indústrias de cosméticos precisam checar seus produtos regularmente quanto à pureza e se estão de acordo com a legislação. As análises de protetores solares também são empregadas no desenvolvimento de novos filtros e formulações, para checar a estabilidade, propriedades e possíveis produtos de degradação, que podem ser tóxicos (GRANGER & BROWN, 2001). O maior desafio no que diz respeito à determinação de filtros solares em formulações fotoprotetoras é a determinação em menor tempo possível, o preparo de amostra, já que esses filtros estão incorporados em uma matriz bastante complexa, e a utilização de reagentes baratos e disponíveis.

A cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*) é umas das técnicas utilizadas para a determinação de alguns filtros solares. O primeiro trabalho publicado com GC foi em 1972 e visou a determinação de cinamatos e salicilatos em bronzeadores. Essa técnica, contudo, não é muito empregada devido ao fato de os filtros solares, de modo geral, não serem voláteis e/ou termoestáveis. A identificação e a quantificação de filtros solares por GC é limitada a determinação de filtros UV ionizáveis, como o ácido para-aminobenzóico (PABA) ou ácido fenilbenzimidazol sulfônico. A derivatização com reagentes sililantes pode aumentar a volatilidade dos compostos e também a sensibilidade do método (SALVADOR & CHISVERT, 2005).

A eletroforese capilar também é uma das técnicas empregadas para a determinação de filtros solares. A técnica mais utilizada é a eletroforese capilar no modo micelar, que é conhecida como cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*) e combina as características da separação eletroforética com aquelas das interações hidrofóbicas entre analito e micela. Essa técnica é muito útil na separação de moléculas com cargas neutras, como é o caso da maioria dos filtros solares. De acordo com os trabalhos reportados, a técnica de MEKC para a determinação de filtros solares se mostrou rápida, eficiente e econômica em relação às outras técnicas. No entanto, os trabalhos se limitaram a determinação de benzofenonas, ácidos para-aminobenzóicos e sulfônicos e cinamatos (WANG & CHEN, 2000; WANG & LEE, 2003).

Outras técnicas foram reportadas para a determinação de filtros solares, como análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de UV-Vis (CHISVERT *et al.*, 2001a), espectrometria Raman (CHENG *et al.*, 1997; OLADEPO & LOPPNOW, 2008) e voltametria (WANG, 2002). No entanto, um estudo detalhado desses trabalhos mostra que os métodos publicados não são adequados para um controle de produção periódico, pois requerem tempo excessivo de análise e pré-tratamentos laboriosos das amostras. Além disso, esses métodos não refletem o grande número de filtros UV e misturas em uso hoje em dia.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) é a técnica mais utilizada para a determinação de filtros UV em

protetores solares. Além de ser uma técnica versátil e prática, ela é compatível com a baixa volatilidade dos compostos. Alguns trabalhos foram publicados com diferentes métodos utilizando HPLC (Quadro I.2).

Quase todos os trabalhos publicados usam HPLC em fase reversa, a qual é ideal para análise de formulações contendo filtros solares, visto que a maioria delas tem base resistente à água. Shaath e colaboradores (1986) publicaram um dos únicos procedimentos em fase normal, mas não houve reprodutibilidade do tempo de retenção.

A coluna escolhida na maioria dos casos é a do tipo C18. Tomasella e colaboradores (1991), e Vanquerp e colaboradores (1999) utilizaram uma coluna C8 apenas para testes de estabilidade dos filtros solares. Fases estacionárias C18 não apresentam efeito de memória e, portanto, os tempos de retenção são mais consistentes (GRANGER & BROWN, 2001).

Tanto eluições isocráticas quanto eluições por gradiente são usadas. Eluições por gradiente permitem uma grande faixa de polaridade do solvente, mas tem a desvantagem de requerer um maior tempo de análise, além de elevar o custo da análise. As fases móveis mais utilizadas são metanol e/ou acetonitrila com água. Visto que os filtros solares geralmente tem o máximo de absorção na região entre 270-360 nm, metanol e acetonitrila são excelentes solventes para serem usados como fase móvel, já que o mesmos possuem altas transmitâncias nessa região e misturam com água em qualquer proporção. Ácidos ou tampões ácidos são utilizados na fase móvel em alguns trabalhos citados na literatura com o objetivo de reduzir a cauda dos picos, pois a maioria das colunas de fase reversa tem material de constituição a base de sílica que só são estáveis em pH entre 2 e 8 (GRANGER & BROWN, 2001).

**Quadro I.2.** Trabalhos publicados com diferentes métodos para determinação de filtros solares utilizando HPLC

Filtros solares analisados	Preparo de amostra	Fase estacionária	Fase móvel	Referência
Benzofenona-3, butil metoxi dibenzoilmetano, octocrileno, salicilato de octila, metoxicinamato de octila, octil dimetil PABA	Diluição com etanol	RP Shimpack (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático 1. CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O pH = 2,7: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (93:7 v/v)	RIBEIRO, 2004
Benzofenona-3, octil dimetil PABA, metoxicinamato de octila, salicilato de octila, homosalato	Diluição com etanol	LiChropher 100RP18 (125 mm x 4,0 mm, 5 µm)	Isocrático H <sub>2</sub> O:HAc:EtOH (29,5:0,5:70 v/v/v)	CHISVERT <i>et al.</i> , 2001a
Benzofenona-3, Octil Dimetil PABA, metoxicinamato de octila, metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano	Extração por fluido supercrítico (SFE)	Hypersil Phenyl (150 mm x 3,0 mm, 5 µm)	Isocrático MeOH:ACN:THF:H <sub>2</sub> O (45:10:10:35 v/v/v/v) c/ 0,5% de HAc	SCALIA, 2000
Benzofenona-3, Octil Dimetil PABA, metoxicinamato de octila, metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano, salicilato de octila, octocrileno, ácido fenilbenzimidazol sulfônico	Diluição em metanol, acetonitrila e tetraidrofurano	Zorbax, C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático MeOH:ACN:THF:H <sub>2</sub> O (40:10:10:40 v/v/v/v) com 0,5% de HAc	SIMEONI <i>et al.</i> , 2005

cont. **Quadro I.2.** Trabalhos publicados com diferentes métodos para determinação de filtros solares utilizando HPLC

Filtros solares analisados	Preparo de amostra	Fase estacionária	Fase móvel	Referência
Benzofenona-3, metilbenzilideno cânfora, metoxicinamato de octila	Diluição em metanol e extração assistida por microondas	Inertsil C18, ODS-2 (150 mm x 1,0 mm, 5 µm)	Isocrático ACN:H <sub>2</sub> O (90:10 v/v)	SHIH & CHENG, 2000
Bis-etilexil oxifenol metoxifenil triazina, Benzofenona-3, metoxicinamato de octila, butil metoxidibenzoilmetano	Diluição com etanol	Nucleodur Gravity RP 18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente ACN:THF:H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> COOH	DENCAUSSE <i>et al.</i> , 2008
Metileno bis-benzotriazolyl tetrametilfenol, octocrileno, metoxicinamato de octila, salicilato de octila	Diluição em dimetil formamida, metanol e acetonitrila	Hypersil RP-C <sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Isocrático MeOH:ACN (90:10 v/v)	SMYRNIOTAKIS & ARCHONTAKI, 2004
Benzofenona-3, butil metoxidibenzoilmetano, metoxicinamato de octila, salicilato de octila e homosalato	Diluição em acetonitrila e água	Novapak C18 (150 mm x 3,9 mm, 4 µm); Symmetry C18 (75 mm x 4,6 mm, 3,5 µm) (colunas em série)	Gradiente ACN:H <sub>2</sub> O	KEDOR-HACKMANN <i>et al.</i> , 2006
Benzofenona-3, benzofenona-4, butil metoxidibenzoilmetano, Octil Dimetil PABA, metoxicinamato de octila, salicilato de octila e homosalato	Diluição em etanol	LiChrospher 100 RP-18, (125 mm x 4,0 mm, 5 µm)	Isocrático EtOH:H <sub>2</sub> O:HAc (70:29,5:0,5 v/v/v) contendo 65,4 mmol L <sup>-1</sup> de hidroxipropil β-ciclodextrina	CHISVERT <i>et al.</i> , 2001b

HAc: ácido acético; ACN: acetonitrila; EtOH: etanol; THF: tetraidrofurano; MeOH: metanol

## **I.6. FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)**

O fator de proteção solar (FPS) de um protetor solar foi desenvolvido como um meio de se avaliar quantitativamente o grau de proteção oferecido pelo produto contra a radiação solar. O FPS é visto como uma medida da eficácia do protetor solar, o qual indica quantas vezes o tempo de exposição ao sol, sem eritema, pode ser aumentado com uso do protetor (BLEASEL & ALDOUS, 2008; NOLE & JOHNSON, 2004; ELBOURY *et al.*, 2007; MILESI & GUTERRES, 2002; WOLF *et al.*, 2001; LONNI *et al.*, 2008; FLOR *et al.*, 2007). Por definição o FPS é a relação entre a menor quantidade de energia UV necessária para produzir um eritema na pele protegida com protetor solar com a quantidade de energia necessária para produzir o mesmo eritema na pele desprotegida (OSTERWALDER & HERZOG, 2009). O FPS é calculado por meio da equação I.1:

$$FPS = \left( \frac{DME(\text{pele com proteção})}{DME(\text{pele sem proteção})} \right) \quad (I.1)$$

onde DME é a dose mínima eritematosa, ou seja, dose mínima necessária para ocorrer o eritema.

A ANVISA estabeleceu obrigatoriedade da indicação do número de proteção solar precedido pela sigla “FPS” ou “SPF” ou das palavras “Fator de Proteção Solar” nos protetores solares. Além disso, no verso da embalagem, deve conter expressões orientativas como as do Quadro I.3 (ANVISA, 2002).

**Quadro I.3.** Expressões orientativas para rotulagem de protetores solares (ANVISA, 2002).

Baixa: ( $2 \leq \text{FPS} < 6$ )	Pele pouco sensível	“Oferece baixa proteção contra queimaduras solares”
Moderada: ( $6 \leq \text{FPS} < 12$ )	Pele sensível	“Oferece moderada proteção contra queimaduras solares”
Alta: ( $12 \leq \text{FPS} < 20$ )	Pele muito sensível	“Oferece alta proteção contra queimaduras solares”
Muito Alta: ( $\text{FPS} \geq 20$ )	Pele extremamente sensível	“Oferece muito alta proteção contra queimaduras solares”

Como a radiação UVB é aproximadamente mil vezes mais eritematosa que a radiação UVA, o FPS é praticamente medido em termos da UVB (PALM & O'DONOGHUE, 2007).

O FPS é dependente da capacidade do produto de absorver energia radiante, que é proporcional à concentração dos compostos absorvedores e/ou refletores de radiação eletromagnética que o compõe, intervalo de absorção e comprimento de onda onde ocorre absorção máxima. A associação de diferentes filtros químicos e físicos em formulações é um recurso empregado para melhorar a eficácia e potencializar o fator de proteção solar (LONNI *et al.*, 2008).

Existem substâncias que, embora destituídas de efeito fotoprotetor intrínseco, determinam o aumento da eficácia das formulações contendo filtros solares. Essas substâncias desempenham diversos papéis na formulação, como por exemplo, a de agentes formadores de filmes (filmógenos), capazes de torná-las altamente resistentes à lavagem com água pois são insolúveis em água, possuindo baixa tensão superficial, conferindo as propriedades de formador de filme. Os agentes de emoliência também podem contribuir com o aumento da eficácia da formulação fotoprotetora por aumentarem sua lipofilicidade, resultando em uma melhor deposição dos filtros solares sobre a pele e conferindo ao produto uma maior resistência à água (AZZELLINI, 1995).

Substâncias que previnem reação inflamatória ocasionada pela radiação UVB também são propostas para a melhoria da eficácia dos protetores solares (COHEN *et al.*, 1994).

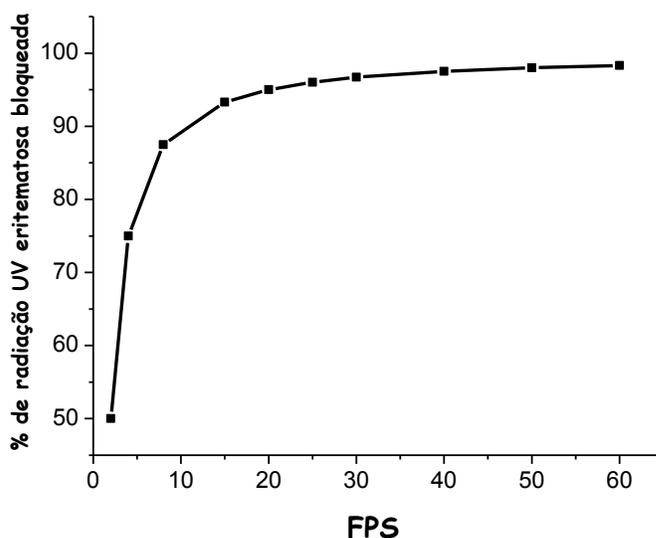
Além dos componentes da formulação fotoprotetora, outros fatores podem ter influência no FPS. A proteção atingida por um fotoprotetor depende da quantidade de produto aplicada sobre a pele, do período de aplicação e reaplicação, da intensidade das atividades físicas que a pessoa pratica, que pode conduzir à produção excessiva de suor ou exposição à água, que resultarão na remoção de parte do filtro aplicado (MILESI & GUTERRES, 2002). O padrão quantitativo de protetor solar por unidade de pele, segundo a ANVISA, é de  $2 \text{ mg cm}^{-2}$ , assim, a cada aplicação deverá ser usada a quantidade de 30 a 40 g do produto por um indivíduo adulto de tamanho e peso normais (FLOR *et al.*, 2007).

O FPS comumente varia entre 2 e 60. Essa variação não é linear, isto é, um protetor com FPS 15 não é metade de um FPS 30 em termos da habilidade de reduzir a radiação eritematosa na pele. A porcentagem de radiação transmitida é dada pela equação I.2 e a porcentagem de radiação bloqueada é dada pela equação I.3 (NASH & TANNER, 2006):

$$UV \text{ transmitida}(\%) = \left( \frac{1}{FPS \times 100} \right) \quad (I.2)$$

$$UV \text{ bloqueada}(\%) = \left( 1 - \frac{1}{FPS} \right) \times 100 \quad (I.3)$$

Isso significa que um produto com FPS 15 bloqueia 93,3 % da radiação UV e um produto com FPS 30 bloqueia 96,7 % da radiação UV, o que resulta em uma diferença de apenas 3,4 % (NASH & TANNER, 2006). O gráfico com a relação entre a porcentagem de radiação UV bloqueada e o fator de proteção solar está apresentado na Figura I.5.



**Figura I.5.** Relação não-linear entre a porcentagem de radiação UV bloqueada e o FPS de formulações fotoprotetoras.

Com o avanço da tecnologia e até mesmo da conscientização da população sobre os efeitos danosos da radiação UV, ficou muito comum serem encontrados fotoprotetores com altos FPS, como 40 ou 50, o que não é necessário, pois a diferença de porcentagem bloqueada entre esses e os fotoprotetores com FPS 30 é muito pequena e insignificante em termos biológicos. Além disso, quanto maior o FPS, mais oneroso se torna o produto e maior é a possibilidade de reações alérgicas, uma vez que o composto filtro solar, que é irritante para a pele, é empregado em concentrações maiores (MILESI & GUTERRES, 2002). Alguns autores defendem, ainda, que quando o valor do FPS é muito elevado, as pessoas sentem-se mais seguras e acabam por se expor ao sol muito mais do que deveriam, aumentando o risco de câncer de pele (CASWELL, 2001; WOLF, 2001).

## **I.7. DETERMINAÇÃO DO FPS**

Para a determinação do FPS de protetores solares, existem basicamente três tipos de metodologias preconizadas: a do FDA (*Food and Drug Administration*), utilizada nos EUA; a da COLIPA (*The European Cosmetics Association*), utilizada nos países europeus e a da SAA (*Standard Australian Association*) (RUVOLO JUNIOR, 1997).

Esses métodos se baseiam no teste *in vivo*. Eles utilizam homens e mulheres com tipos de pele definidos e consideram a resposta biológica. A pele de cada pessoa testada deve ser íntegra, sem bronzamento e não deve ter uma resposta anormal a luz solar induzida por medicamentos ou naturalmente. Uma quantidade de produto de 2 mg cm<sup>-2</sup> é aplicada na pele das costas de voluntários. Após 15 minutos, as áreas com o produto são irradiadas com um simulador solar que emite um espectro de emissão contínuo entre 290-400 nm. A avaliação visual das reações na pele (eritema perceptível) é feita 16-24 horas após a exposição à radiação UV por um avaliador treinado. A dose mínima eritematosa (MED) é medida pela quantidade de energia por unidade de área (J cm<sup>-2</sup>) necessária para causar um eritema mínimo, que é proporcional à duração da exposição à radiação. O FPS do produto é calculado pela média aritmética de todos os FPS obtidos para cada indivíduo (BENDOVIÁ *et al.*, 2007; BLEASEL & ALDOUS, 2008).

O método *in vivo* é contestado por vários autores por ser um método lento, laborioso e, principalmente, por utilizar seres humanos. Vários grupos têm se dedicado ao desenvolvimento de um método *in vitro* que seja eficaz e elimine a necessidade de se utilizar indivíduos nos testes.

Os métodos *in vitro* mais empregados são baseados em técnicas de análises espectrofotométricas envolvendo medidas de transmissão ótica na região ultravioleta. Numa delas, proposta por Mansur e colaboradores (MANSUR *et al.*, 1986), mede-se a transmissão de uma solução do protetor diluída em um solvente apropriado. Um segundo método, proposto por Diffey e Farr (1991), envolve a medição da transmissão ótica através de um filme fino do produto aplicado sobre um substrato teste artificial.

Evoluções desses métodos *in vitro* foram propostas também por outros autores e, embora sejam precisos, não apresentaram uma boa correlação com o método oficial (*in vivo*). Uma das limitações desses métodos é que não é considerado um fator envolvendo a interação da pele humana com o produto. Geralmente os testes *in vitro* são aplicados como “pré-testes” como uma previsão do FPS antes de se aplicar o produto em humanos, reduzindo assim, os riscos de queimaduras nos voluntários submetidos aos testes *in vivo*.



---

---

## **II. OBJETIVOS**

---

---



O objetivo geral do trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de filtros solares em loções fotoprotetoras, usando a cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de arranjo de diodos, assim como avaliar a possibilidade do uso da fluorescência de raios-X para estimar o fator de proteção solar.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Estabelecimento e otimização das condições cromatográficas (fase estacionária e composição da fase móvel) para a separação e determinação dos principais filtros orgânicos usados em formulações fotoprotetoras comercializadas no Brasil.
- Avaliar diferentes preparos de amostra.
- Validar o método para a determinação dos filtros orgânicos por HPLC-DAD.
- Aplicar o método na análise de amostras.
- Verificar se as formulações comerciais obedecem à resolução RDC nº 47 de 16 de março de 2006 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006), que trata dos filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, limitando a concentração máxima de cada substância nas formulações comercializadas no Brasil.
- Avaliar a potencialidade do uso da fluorescência de raios-X para determinar o FPS, usando métodos quimiométricos.



---

---

## **III. EXPERIMENTAL**

---

---



### III.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões analíticos utilizados foram:

- Ácido 2-fenil 5-benzimidazolsulfônico (ÁCIDO FENILBENZIMIDAZOL SULFÔNICO) (**AFS**) 96%, Aldrich;
- 2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (BENZOFENONA-3) (**BZ3**) 98%, Aldrich;
- 2-Etilexil 2-ciano-3,3-difenilacrilato (OCTOCRILENO) (**OCT**) 97%, Aldrich;
- 4-Metil-benzilideno cânfora (4-METIL BENZILIDENO CÂNFORA) (**MBC**), AccuStandard;
- 2-Etilexil 4-(dimetil-amino) benzoato (OCTIL DIMETIL PABA) (**PABA**) 98%, Aldrich;
- Octil-metoxicinamato (METOXICINAMATO DE OCTILA) (**MCE**), AccuStandard;
- 1-(4-Metoxifenil)-3-(4-tert-butilfenil)-1,3-propanodiona (BUTIL METOXI DIBENZOIL METANO) (**BMDM**), Aldrich;
- Salicilato de 3,3,5-trimetilcicloexila (HOMOSALATO) (**HMS**), Aldrich;
- Salicilato de 2-etilexila (SALICILATO DE OCTILA) (**SCL**) 99%, Aldrich.

Os reagentes e solventes utilizados foram:

- Etanol P.A. 99,7%, J. T. Baker;
- Hidróxido de sódio P. A. 97%, Synth;
- Metanol grau HPLC, Tedia;

A água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q da Milipore (EUA).

### III.1.1. SOLUÇÕES ESTOQUE

As soluções padrão estoque foram preparadas separadamente, na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , exceto o padrão BMDM que foi preparado na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os padrões de BZ3, OCT, MBC, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL foram pesados, dissolvidos e diluídos em metanol grau HPLC, exceto o padrão AFS, que não é solúvel em metanol, foi dissolvido em 1 mL de hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e então diluído em metanol. As soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar e em freezer à  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### III.1.2. SOLUÇÕES PADRÃO DE TRABALHO

As soluções padrão de trabalho para a avaliação da linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade foram preparadas nas concentrações de 1 a  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  a partir das soluções estoque mediante diluição em MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v (fase móvel).

As soluções padrão de trabalho para aplicação nas avaliações de precisão e exatidão e análise de amostras foram preparadas nas concentrações de 1 a  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  a partir das soluções estoque mediante diluição em MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção 88:12 v/v (fase móvel).

Todas as soluções padrão de trabalho foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas sob refrigeração ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) em um tempo máximo de três meses.

## III.2. EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo à líquido equipado com sistema de bombeamento binário modelo 600 (Waters), injetor Rheodyne 7725 com alça de amostragem de  $20 \mu\text{L}$ , associado

a um detector por arranjo de fotodiodos PDA modelo 996 (Waters, USA);

- Cromatógrafo à líquido equipado com sistema de bombeamento binário modelo 1525 (Waters), injetor manual Rheodyne modelo 7725 com alça de amostragem de 50  $\mu\text{L}$ , associado a um detector por arranjo de fotodiodos PDA modelo 2996 (Waters, USA);
- Forno para coluna cromatográfica modelo 1500 (Waters, USA);
- Ultrassom Ultra Cleaner 1450 (Unique, Brasil);
- Centrífuga Zentrifugen Rotofix 32<sup>a</sup> (Hettich, Alemanha);
- Compressor Aspirador modelo 089-CAL (Fanem, Brasil);
- Balança analítica modelo XT220A (Precisa, Brasil);
- Espectrômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) modelo EDX-700, constituído por um tubo de Rh e um detector semi-condutor de Si (Li) (Shimadzu, Japão).

### **III.3. PROCEDIMENTOS**

#### **III.3.1. TESTES DAS FASES ESTACIONÁRIAS**

As fases estacionárias testadas foram:

- ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), ACT, Escócia;
- X-Bridge<sup>™</sup> C18 (150 mm x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), WATERS, EUA;
- X-Terra<sup>®</sup> RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), WATERS, EUA;
- X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), WATERS, EUA.

Para o teste das fases estacionárias foi utilizada uma solução contendo todos os padrões analíticos preparados em metanol grau HPLC a partir das soluções estoques e na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O cromatógrafo a líquido utilizado nesse teste foi o Waters modelo 600. Foi injetada a solução contendo a mistura de todos os padrões analíticos com uma fase móvel inicial de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15 v/v e então, foram otimizados o tipo de eluição e a composição da fase móvel para obter a melhor separação dos compostos no menor tempo possível. As eluições testadas para cada fase estacionária encontram-se descritas na Tabela III.1.

As vazões utilizadas foram selecionadas de modo que a pressão do sistema não ultrapassasse a pressão definida para cada coluna cromatográfica. As vazões foram de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  para as colunas ACE e X-Terra RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$  para a coluna X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) e vazão de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  para a coluna X-Bridge<sup>™</sup> C18.

**Tabela III.1.** Tipos de eluições e fases móveis avaliadas para as fases estacionárias.

Coluna	Eluição	Tempo (min)	% MeOH	%H <sub>2</sub> O
<b>ACE</b>	Isocrático 1	-	85	15
	Isocrático 2	-	88	12
	Gradiente 1	0	80	20
		5	90	10
		20	80	20
	Gradiente 2	0	70	30
		5	90	10
		15	70	30
	Gradiente 3	0	70	30
		5	90	10
		15	80	20
	Gradiente 4	30	70	30
		0	85	15
		5	90	10
	Gradiente 5	15	85	15
		0	85	15
		5	90	10
	Gradiente 6	15	80	20
		25	85	15
		0	85	15
	Gradiente 7	5	90	10
		10	80	20
		20	85	15
	<b>X-Bridge</b>	Isocrático 1	-	85
Gradiente 7		0	85	15
		15	85	15
<b>X-Terra<sup>®</sup> RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)</b>	Isocrático 1	-	85	15
	Isocrático 3	-	80	20
	Gradiente 8	0	85	15
		5	80	20
		10	85	15
<b>X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)</b>	Isocrático 1	-	85	15
	Isocrático 3	-	80	20
	Isocrático 4	-	70	30

### III.3.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Para avaliar a influência da temperatura na separação cromatográfica dos filtros solares foi utilizada uma solução contendo todos os padrões analíticos preparados em metanol grau HPLC a partir das soluções estoques e na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

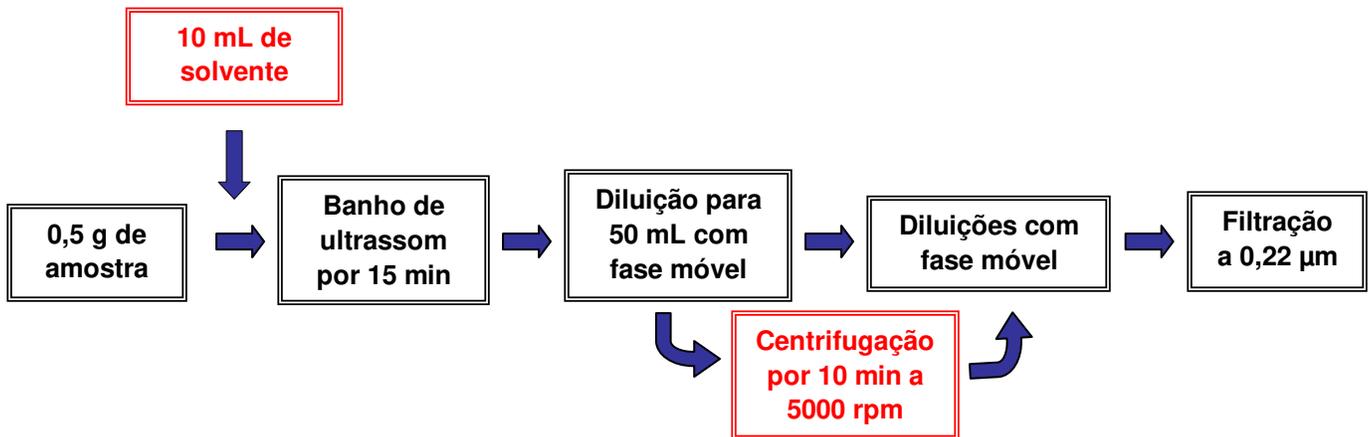
O cromatógrafo à líquido utilizado nesse teste foi o Waters modelo 1525 com a coluna cromatográfica ACE C18. Injetou-se a solução contendo a mistura de todos os padrões analíticos com uma fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  em diferentes temperaturas da coluna: 20, 30, 33, 35, 37, 40, 45 e  $50^\circ \text{C}$ .

### III.3.3. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA

Para a otimização do preparo de amostra foram selecionadas duas loções fotoprotetoras disponíveis comercialmente de marcas diferentes, neste trabalho denominadas de A e B, com fator de proteção solar (FPS) 15. O preparo foi testado quanto ao:

- Tipo de solvente para a diluição dos filtros: metanol ou etanol
- Uso da centrifugação

O preparo da amostra consistiu em pesar  $0,5 \text{ g}$  ( $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) da amostra diretamente em um balão volumétrico de  $50 \text{ mL}$  e adicionar  $10 \text{ mL}$  do solvente em teste (metanol ou etanol). A suspensão foi levada à ultrassom por 15 minutos e então o volume do balão foi completado com fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v. Uma parte das amostras foi centrifugada por 10 minutos a  $5000 \text{ rpm}$ . As soluções foram então diluídas de acordo com a concentração de cada componente, com fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v. Anterior à análise cromatográfica, todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de  $0,22 \mu\text{m}$ . Um esquema geral, com apontamentos das principais etapas envolvidas no preparo de amostra é ilustrado pela Figura III.1.



**Figura III.1.** Fluxograma do preparo de amostra.

Os compostos foram separados em uma coluna ACE, utilizando fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

### III.3.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros de validação avaliados nesse trabalho foram:

- Seletividade;
- Linearidade;
- Faixa de aplicação;
- Sensibilidade;
- Precisão (intra e inter ensaio);
- Exatidão.

### III.3.4.1. LINEARIDADE, FAIXA DE APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE

Para verificar a linearidade da curva analítica, foram preparadas soluções contendo 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0 e 40,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos padrões BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL em fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v.

As soluções foram injetadas no cromatógrafo à líquido modelo 1525 com fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v e coluna ACE C18. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda máximo de cada composto.

Na ordem de obter a curva analítica para cada analito, as respectivas áreas dos picos no cromatograma foram plotadas contra a concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As curvas analíticas foram obtidas usando o procedimento de regressão quadrada mínima linear.

### III.3.4.2. PRECISÃO

Neste trabalho foram avaliadas a precisão intra-ensaio e inter-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de uma mesma amostra, em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. As amostras empregadas foram: amostra B com FPS 20 para avaliar a precisão em relação aos compostos OCT e BMDM e a amostra J com FPS 30 para avaliar a precisão em relação aos compostos BZ3, MCE, HMS, SCL. Estes compostos avaliados encontravam-se presentes nas respectivas amostras como mostra a Tabela IV.4. Os compostos PABA e MBC, que não estavam presentes na formulação, foram adicionados à amostra J antes de seu preparo. A precisão intra-ensaio foi expressa pelo coeficiente de variação obtida nas cinco determinações.

A precisão inter-ensaio foi determinada pela análise das mesmas amostras descritas anteriormente, no entanto, as análises foram realizadas em três dias diferentes, usando o mesmo equipamento e realizadas pelo mesmo analista.

No primeiro dia as amostras foram analisadas em quintuplicata e nos dois dias subsequentes em triplicata. A precisão inter-ensaio foi expressa pelo coeficiente de variação obtido nos três dias diferentes (n=11).

O preparo de amostra consistiu na pesagem de 0,5 g ( $\pm 0,1$  mg) da amostra em balão de 50 mL e mediante adição de 10 mL de metanol. A suspensão foi levada a ultrassom por 15 minutos e após isso, os balões foram avolumados com MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v (fase móvel). As soluções foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e então foram realizadas as diluições. Anterior à análise cromatográfica, as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,22  $\mu$ m.

As soluções das amostras foram injetadas no cromatógrafo à líquido modelo 1525 com fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, coluna ACE C18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50  $\mu$ L. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda máximo de cada analito. A quantificação foi realizada mediante padronização externa.

### III.3.4.3. EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada mediante ensaio de recuperação. Para tanto, foi realizada a fortificação (50 %) da amostra B com FPS 20 para avaliar a exatidão em relação aos compostos OCT e BMDM e a amostra J com FPS 30 para avaliar a exatidão em relação aos compostos BZ3, MCE, HMS, SCL. Os compostos PABA e MBC que não estavam presentes nas formulações avaliadas foram adicionados à amostra J antes de seu preparo. As análises foram realizadas em quintuplicata.

Para o preparo de amostra foi adicionado 50% de padrão, calculado a partir dos resultados de precisão inter-ensaio (Tabela III.2) à 0,25 g ( $\pm 0,1$  mg) da amostra em balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 10 mL de metanol e a suspensão foi levada a ultrassom por 15 min. O volume do balão foi completado com MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v (fase móvel) e a mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Foram feitas as diluições necessárias com fase móvel e anterior à análise cromatográfica, as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,22  $\mu$ m.

**Tabela III.2.** Quantidade de padrão adicionado na amostra baseado nos resultados de precisão inter-ensaio (50 %).

Compostos	Quantidade adicionada em 0,25 g de amostra (mg)
BZ3	9,80
MBC	0,08
OCT	20,03
PABA	4,00
MCE	14,83
BMDM	3,20
HMS	2,03
SCL	12,70

As soluções foram injetadas no cromatógrafo à líquido modelo 1525 com fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, coluna ACE C18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50  $\mu$ L. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda máximo de cada analito. A quantificação foi realizada mediante padronização externa, usando a curva analítica no solvente.

### III.3.4.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS MEDIANTE MÉTODO POR ADIÇÃO DE PADRÃO

A curva por adição de padrão foi construída para o composto OCT. Foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão sob 0,5 g ( $\pm 0,1$  mg) da amostra B (FPS 20) em balão volumétrico de 50 mL. As quantidades de padrão adicionadas foram estabelecidas considerando a análise prévia da formulação por padronização externa e estão apresentadas na Tabela III.3.

A suspensão foi levada a ultrassom por 15 minutos e então o volume do balão foi completado com MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v (fase móvel). A mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. Foram feitas as diluições necessárias com fase móvel e anterior à análise cromatográfica, as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,22  $\mu$ m.

**Tabela III.3.** Quantidade de padrão adicionado em cada ponto da curva por adição de padrão

	Porcentagem de padrão adicionado (%)	Quantidade de padrão adicionado (mg)
<b>Ponto 1</b>	0	-
<b>Ponto 2</b>	15	6,00
<b>Ponto 3</b>	30	12,00
<b>Ponto 4</b>	45	18,00
<b>Ponto 5</b>	60	24,00

As soluções foram injetadas no cromatógrafo à líquido modelo 1525 com fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, coluna ACE C18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50  $\mu$ L. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda máximo do composto OCT.

A concentração foi determinada relacionando a quantidade de padrão adicionado à amostra com as respectivas áreas obtidas (método de adição de padrão).

### III.3.5. ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

O método desenvolvido e validado foi aplicado nas amostras A (FPS 4, 8, 15, 30, 50 e 60), B (FPS 8, 15, 20, 30, 40 e 60), C, D, E, F, G, H, I, J, L, M e N (FPS 30) de diferentes fabricantes comercializadas no Brasil (exceto amostras L, M e N). O país de origem (fabricação) das amostras e os ingredientes ativos presentes em cada uma (de acordo com o rótulo) são mostradas na Tabela III.4.

O preparo de amostra seguiu o procedimento de preparo do ensaio de precisão (Item III.3.4.2).

As soluções foram injetadas no cromatógrafo à líquido modelo 1525 com fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, coluna ACE C18, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50 µL. A quantificação dos compostos foi feita mediante padronização externa.

**Tabela III.4.** Origem e ingredientes ativos presentes nas amostras analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>País de origem</b>	<b>Ingredientes ativos</b>
<b>A</b>	Brasil	BZ3, OCT, BMDM e SCL
<b>B</b>	Brasil	OCT e BMDM
<b>C</b>	Brasil	MCE
<b>D</b>	França	OCT e BMDM
<b>E</b>	Brasil	BZ3, PABA e BMDM
<b>F</b>	EUA	BZ3, MCE, BMDM, HMS e SCL
<b>G</b>	Brasil	OCT e MCE
<b>H</b>	EUA	BZ3, OCT, BMDM, HMS e SCL
<b>I</b>	Brasil	BZ3, MCE, BMDM, HMS e SCL
<b>J</b>	Brasil	BZ3, MCE, HMS e SCL
<b>L</b>	Alemanha	OCT, BMDM e SCL
<b>M</b>	Alemanha	OCT e BMDM
<b>N</b>	Alemanha	OCT e BMDM

### III.3.6. DETERMINAÇÃO DO FPS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Foram utilizadas amostras da marca B com os FPS 8, 15, 20, 30, 40 e 60. As amostras de demais FPS utilizadas (10, 12, 13, 17, 21, 23, 25, 31, 33, 35, 37, 41, 43, 45, 47, 53, 55 e 57) foram obtidas através da combinação das amostras FPS 8 e 60.

Para as medidas analíticas foram utilizadas celas de FRX (Chemplex 1300, diâmetro externo de 30,7 mm e volume interno de 7 cm<sup>3</sup>) montadas com seu fundo sustentado por um filme de Mylar<sup>®</sup> (Chemplex 100), de espessura de 2,5 mm. As celas foram preenchidas com a amostra, garantindo completa absorção do feixe de raios X. A voltagem aplicada no tubo de raios X foi igual a 50 kV, com 25% de tempo morto no

detector semiconductor de Si(Li). Os espectros foram obtidos sequencialmente, com um passo de 0,02 keV, de 0 a 40 keV. O tempo de irradiação foi de 120 s e para cada amostra foram preparadas 2 celas de FRX.

O tratamento dos dados foi realizado com o programa computacional Pirouette® 3.11 (Infometrix Co., 2003). Os dados do espectro (incluindo a região de espalhamento de raios X) foram submetidos a tratamento quimiométrico por PCA e PLS, para a construção dos modelos de calibração e validação. Para todos os casos, o pré-processamento utilizado foi o de dados centrados na média, o que, de maneira geral, consiste em subtrair o elemento de cada coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, obtendo-se como resultado uma matriz de emissão de raios X. Os espectros não sofreram qualquer tipo de transformação.

---

---

## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---



Foi realizado previamente um levantamento para verificar os compostos ativos mais empregados nas principais marcas de loções fotoprotetoras comercializadas no Brasil. Com base nessa pesquisa, selecionaram-se nove compostos a serem estudados: ácido fenilbenzimidazol sulfônico (**AFS**); benzofenona-3 (**BZ3**); octocrileno (**OCT**); 4-metilbenzilideno cânfora (**MBC**); octil dimetil PABA (**PABA**); metoxicinamato de etilexila (**MCE**); butil metoxi dibenzoil metano (**BMDM**); homosalato (**HMS**) e salicilato de etilexila (**SCL**), cujas estruturas estão apresentadas no Quadro I.1 (pág. 10 e 11).

#### **IV.1. SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

A escolha das melhores condições cromatográficas, isto é, fase estacionária e tipo de eluição da fase móvel, levou em consideração os parâmetros cromatográficos: resolução, número de pratos e fator de assimetria.

A resolução,  $R_s$ , é a medida quantitativa da separação de dois picos adjacentes. Quanto maior o valor de resolução, melhor será a separação entre picos de substâncias que eluem seguidamente. Espera-se que a resolução se apresente no valor mínimo equivalente a 1,5 ( **$R_s > 1,5$** ) onde indica separação completa de dois compostos. O valor de resolução foi estimado por meio da diferença entre os máximos dos picos de interesse e a média da base dos picos, conforme a equação IV.1 (COLLINS *et al.*, 2006):

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1} / w_{b2} + w_{b1}) \quad (IV.1)$$

Onde  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  são os tempos de retenção de dois compostos que apresentam picos adjacentes e  $w$  são as larguras das bases dos picos.

O número de pratos (N) é uma medida da eficiência da interação da fase estacionária com cada componente de uma mistura que estejam eluindo através da coluna cromatográfica. Em termos práticos, o número de pratos mede o grau de alargamento do pico. Quanto maior o número de pratos, melhor a eficiência do sistema cromatográfico. O valor de N deve ser superior a 2000 para cromatografia líquida de alta eficiência. Essa grandeza foi calculada por meio da equação IV.2 (COLLINS *et al.*, 2006):

$$N = 16 (t'_R/w_b)^2 \quad (IV.2)$$

O fator de assimetria (As) é uma indicação quantitativa da simetria do pico. Quando o pico é exatamente simétrico o valor de As é igual a um (**As = 1**). O As foi calculado por meio da equação IV.3 (COLLINS *et al.*, 2006):

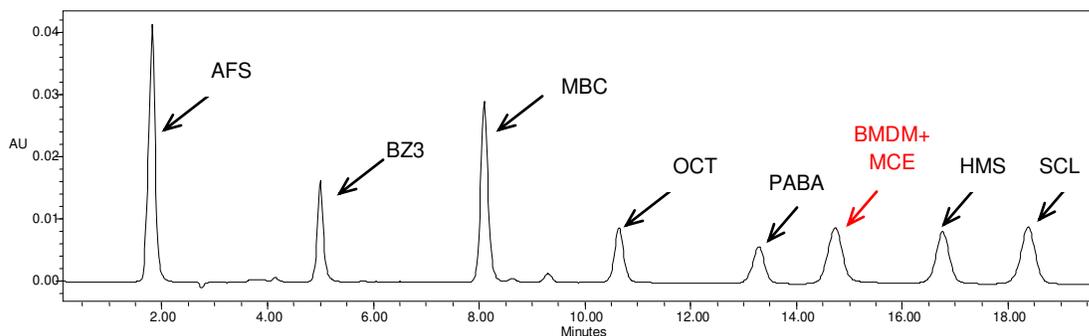
$$As = b_{(10\% h)} / a_{(10\% h)} \quad (IV.3)$$

onde a e b são medidas da simetria da largura do pico a altura de 10%.

Espera-se que os fatores de assimetria estejam entre 0,9 e 1,2 para estar em conformidade com o sistema cromatográfico (SNYDER *et al.*, 1997).

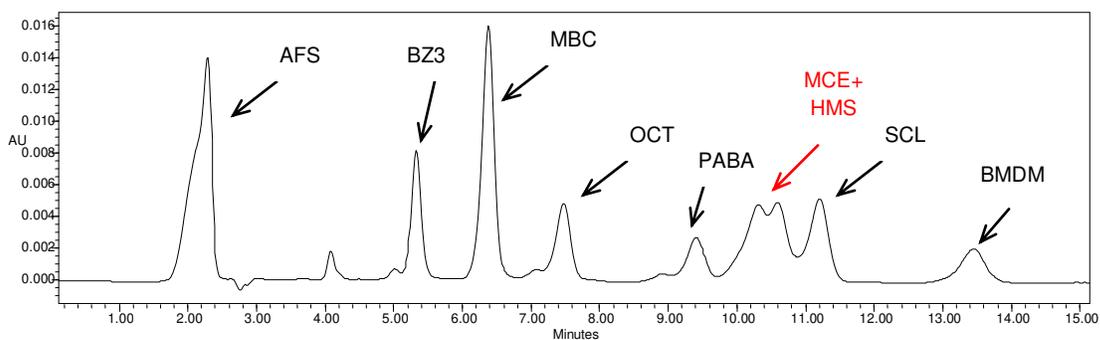
Foram avaliadas quatro colunas cromatográficas, todas de fase C18, para realizar a separação dos nove compostos: ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), ACT, Escócia; X-Bridge<sup>™</sup> C18 (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm), WATERS, EUA; X-Terra<sup>®</sup> RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), WATERS, EUA e X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm), WATERS, EUA. Como fase móvel foi empregada uma mistura de metanol e água. Foi avaliado o modo de eluição isocrático e quando não foi possível a separação dos compostos, foi também testada eluição por gradiente.

A coluna X-Bridge™ C18 não apresentou seletividade para os compostos BMDM e do MCE, que co-eluíram nas condições testadas, mesmo quando a proporção da fase móvel foi modificada. Um cromatograma característico está apresentado na Figura IV.1.



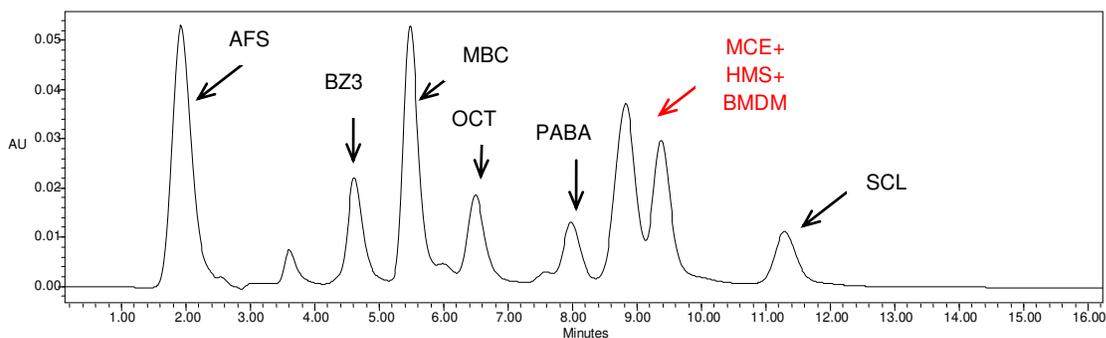
**Figura IV.1.** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica X-Bridge™ C18, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15, v/v, volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$ , vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm.

A coluna X-Terra® RP18 também não apresentou a seletividade requerida, mas nesse caso foi para os compostos MCE e HMS, que co-eluíram quando empregado como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15 v/v (Figura IV.2). Outras eluições foram avaliadas a fim de separar os compostos MCE e HMS, mas essa separação não foi possível no tempo da corrida de 30 minutos. Além disso, houve uma maior assimetria dos picos.



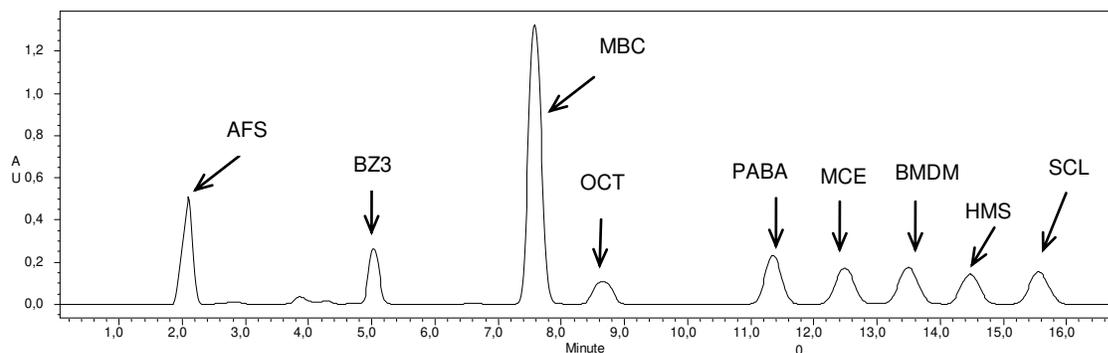
**Figura IV.2.** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica X-Terra<sup>®</sup> RP18, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15, v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm.

Uma mesma coluna X-Terra<sup>®</sup> RP18, no entanto com menores partículas ( $3,5 \mu\text{m}$ ), também não apresentou seletividade para os compostos MCE, HMS e BMDM, que eluíram praticamente no mesmo tempo de retenção usando como fase móvel uma mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15 v/v (Figura IV.3). Outras proporções de solventes foram empregadas, mas não foi possível separar todos os compostos com resolução adequada.



**Figura IV.3.** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica X-Terra<sup>®</sup> RP18 (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15, v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: 238 nm.

A coluna ACE C18 apresentou seletividade para todos os compostos em estudo, usando como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 85:15 v/v. Outras eluições isocráticas e gradientes foram avaliadas com o propósito de diminuir o tempo de análise. A eluição que apresentou melhor separação em menor tempo de análise foi a fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, fornecendo, para todos os compostos, resolução maior que 1,5, número de pratos maior que 2000 e fator de assimetria entre 0,9 e 1,2. Um cromatograma característico está apresentado na Figura IV.4. Os valores de  $R_s$ , N e As estão apresentados na Tabela IV.1.



**Figura IV.4.** Cromatograma obtido para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12, v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de absorção de cada composto.

**Tabela IV.1.** Valores de  $R_s$ ,  $A_s$  e  $N$  para a fase estacionária ACE C18, utilizando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v.

	$R_s^*$	$A_s$	$N$
<b>BZ3</b>	-	1,13	11579
<b>MBC</b>	12,1	1,08	14626
<b>OCT</b>	4,5	1,03	15097
<b>PABA</b>	8,7	1,05	17763
<b>MCE</b>	3,4	1,03	17744
<b>BMDM</b>	3,0	1,04	16701
<b>HMS</b>	1,8	1,06	24846
<b>SCL</b>	3,0	1,04	23594

\* Calculada em relação ao pico adjacente de menor tempo de retenção.

Embora todas as fases estacionárias testadas sejam C18, elas apresentaram diferenças na seletividade e resolução quando aplicadas a separação dos filtros solares. Essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes tecnologias de preparo dessas fases estacionárias. As fases X-Terra e X-Bridge, fabricadas pela Waters Corporation, utilizam a chamada sílica híbrida de primeira ou segunda geração.

Partículas esféricas híbridas orgânicas-inorgânicas foram introduzidas pela Waters em 1999, na tentativa de se obter maior aplicação das fases C8 e C18. Trabalhos demonstraram que fases a base de sílica híbrida permitem o uso de fase móvel em ampla faixa de pH e altas temperatura sem perda de eficiência e sem degradação da coluna, ao contrário do que acontece com as fases quimicamente ligadas a base de sílica pura (SILVA *et al.*, 2004).

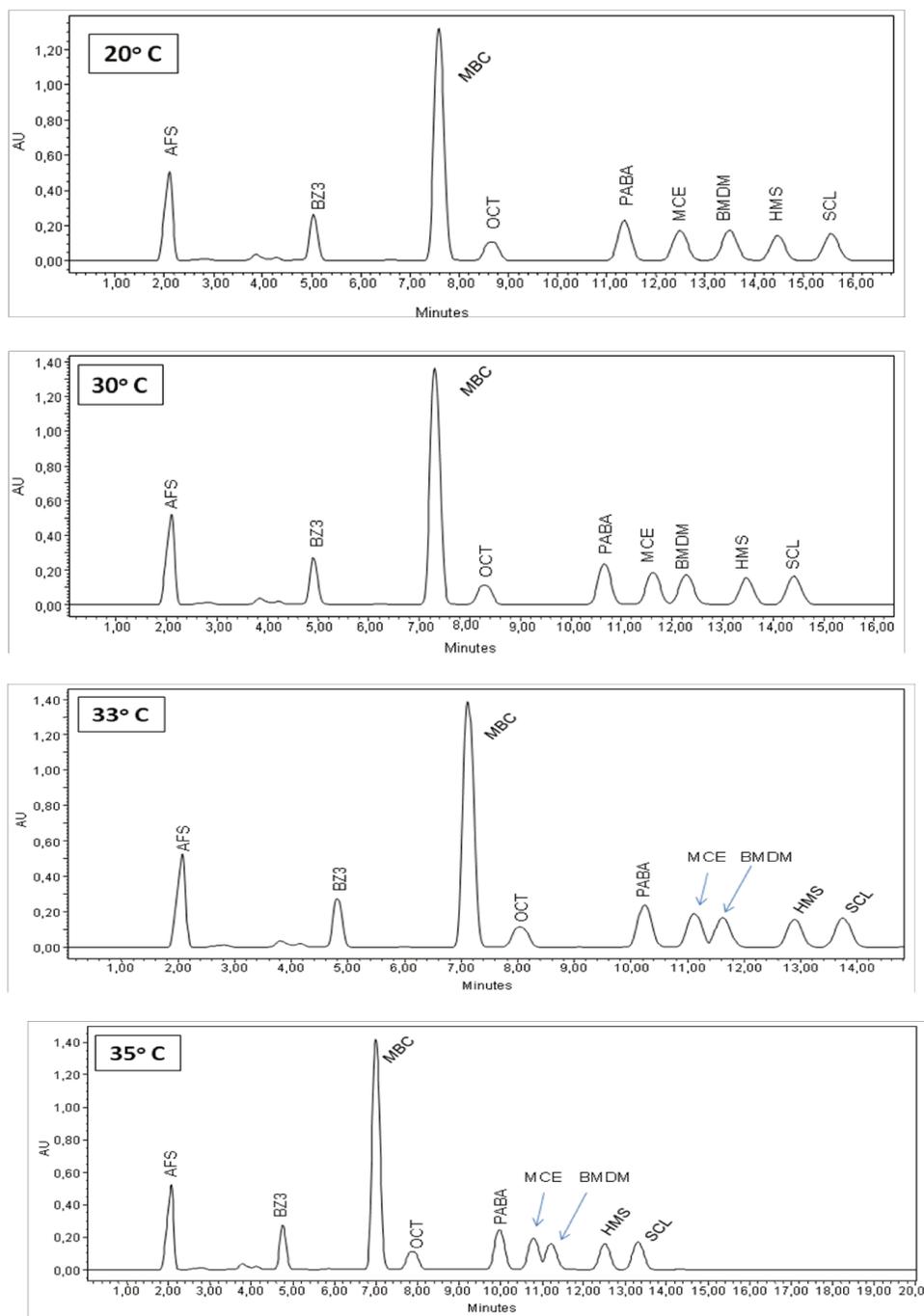
As colunas X-Terra são a primeira geração de sílica híbrida e são baseadas em uma mistura dos monômeros tetraetoxissilano e metiltrietoxissilano. As colunas X-Bridge tem fase baseada na sílica híbrida de segunda geração, que emprega os monômeros tetraetilssilano e bis(trietoxissilil)etano. Uma importante diferença entre as duas fases, é que a X-Terra tem grupos metila incorporados na superfície e na estrutura interna de suas partículas e uma concentração relativamente baixa de grupos C18 ligados. Para a X-Bridge, a maioria das pontes de etila residem na estrutura interna do material suportando maior densidade de ligação de grupos C18 na superfície. Diferenças na superfície química e densidade de ligação podem refletir em diferenças de solvatação da fase estacionária e nas propriedades de retenção (KIRIDENA *et al.*, 2007). Isso pode explicar a inversão da ordem de eluição dos compostos BMDM, HMS e SCL observada nos cromatogramas das fases estacionárias X-Terra e X-Bridge.

No desenvolvimento do método, optou-se por excluir o composto AFS, pois este não apresentou retenção nas fases estacionárias empregadas, eluindo praticamente no tempo de retardamento da fase móvel.

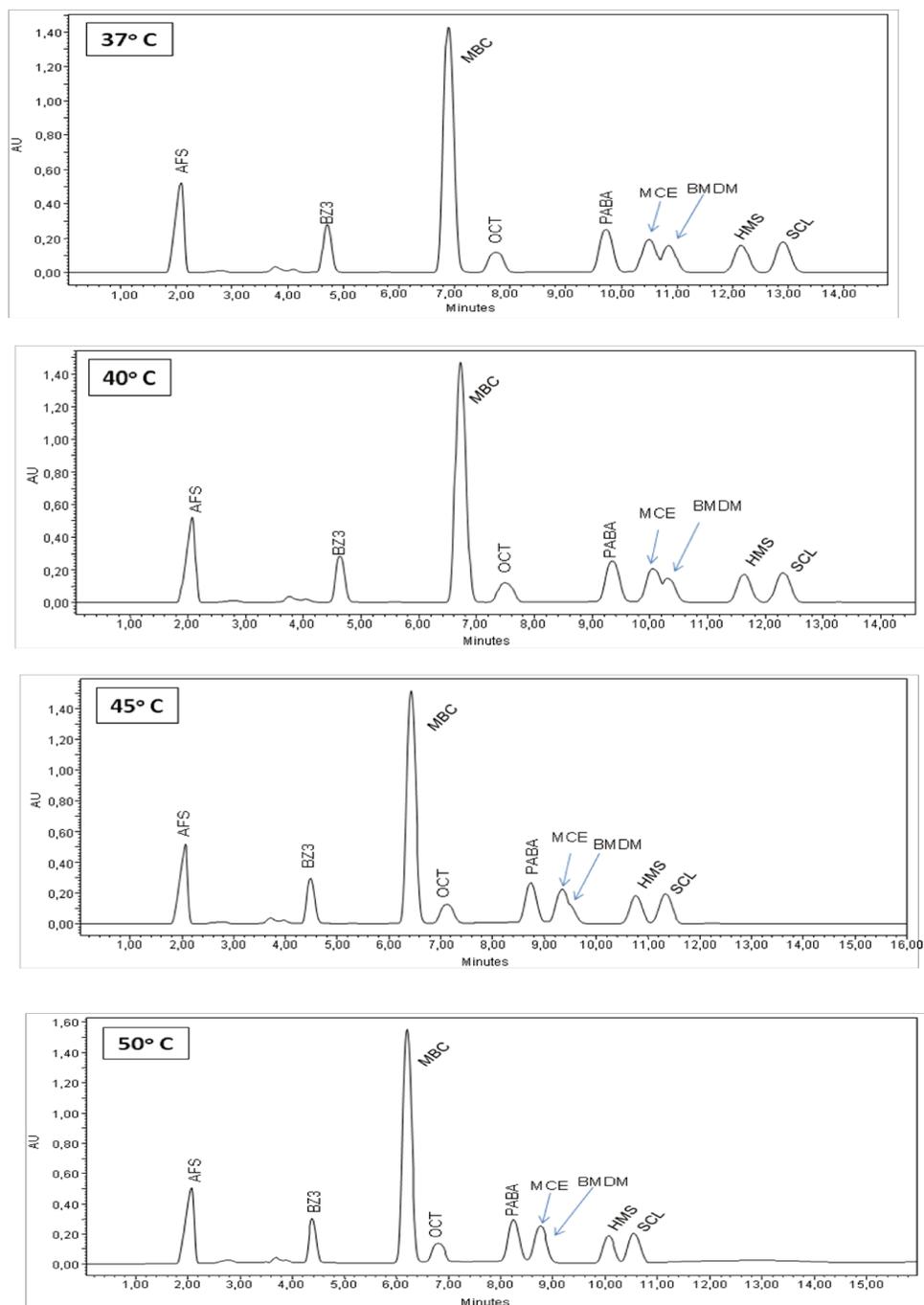
## **IV.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA**

Foi verificado que a temperatura é um parâmetro que afeta a separação dos compostos em estudo. Desta forma, foi realizado um teste para a separação dos compostos a diferentes temperaturas no intervalo de 20 a 50 °C.

Os cromatogramas da separação dos filtros solares obtidos nas temperaturas de 20, 30, 33, 35, 37, 40, 45 e 50° C são mostrados na Figura IV.5.a e Figura IV.5.b.



**Figura IV.5.a)** Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, ODP, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) nas temperaturas de 20, 30, 33, 35° C, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$  e vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Comprimento de onda de detecção: máximo de absorção de cada composto.



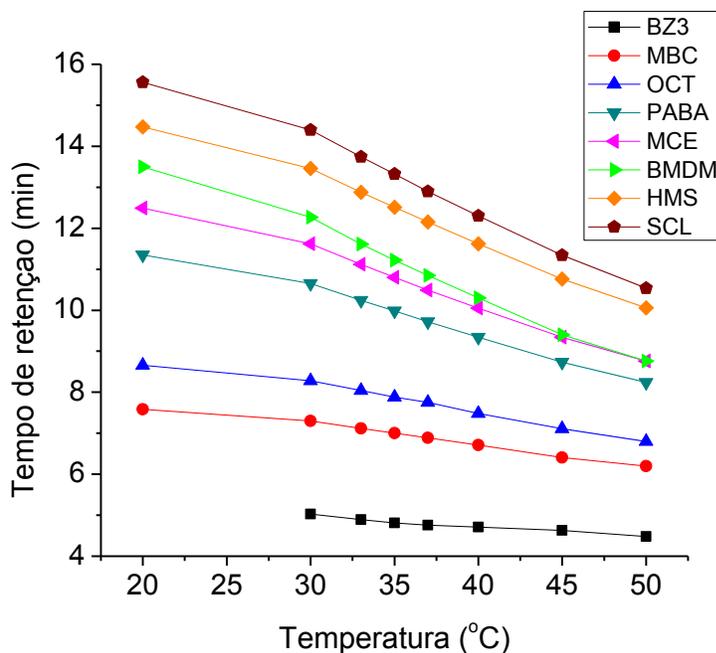
**Figura IV.5.b)** Cromatogramas obtidos para a separação dos padrões AFS, BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL na concentração  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna analítica ACE C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) nas temperaturas de 37, 40, 45 e 50 °C, fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$ , vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. Comprimento de onda de detecção: máximo de absorção de cada composto.

A avaliação da influência da temperatura na separação cromatográfica dos filtros solares levou em consideração os parâmetros cromatográficos: tempo de retenção e resolução. Os valores são apresentados na Tabela IV.2. Um gráfico de tempo de retenção em função da temperatura está apresentado na Figura IV.6.

**Tabela IV.2.** Tempos de retenção ( $t_R$ ) (em minutos) e resolução ( $R_S$ ) dos filtros solares. Coluna: ACE C18, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup> e temperaturas da coluna de 20, 30, 33, 35, 37, 40, 45 e 50 ° C.

		20°C	30°C	33°C	35°C	37°C	40°C	45°C	50°C
<b>BZ3</b>	$t_R$ (min)	5,0	4,9	4,8	4,8	4,7	4,6	4,5	-
	$R_S^*$	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MBC</b>	$t_R$ (min)	7,6	7,2	7,1	7,0	6,9	6,7	6,4	6,2
	$R_S^*$	2,8	3,1	3,6	3,4	3,4	3,8	3,7	-
<b>OCT</b>	$t_R$ (min)	8,7	8,3	8,0	7,9	7,8	7,5	7,1	6,8
	$R_S^*$	2,4	2,3	2,2	2,2	2,2	2,0	1,8	1,7
<b>PABA</b>	$t_R$ (min)	11,4	10,7	10,2	10,0	9,7	9,3	8,7	8,2
	$R_S^*$	5,4	5,0	4,7	4,6	4,4	4,3	-	-
<b>MCE</b>	$t_R$ (min)	12,5	11,6	11,1	10,8	10,5	10,0	9,3	8,8
	$R_S^*$	2,2	2,0	1,9	1,8	1,7	-	1,1	1,3
<b>BMDM</b>	$t_R$ (min)	13,5	12,3	11,6	11,2	10,8	10,3	9,3	8,8
	$R_S^*$	1,8	1,3	1,0	0,9	0,9	-	-	-
<b>HMS</b>	$t_R$ (min)	14,5	13,5	12,8	12,5	12,2	11,6	10,8	10,1
	$R_S^*$	1,7	2,3	2,5	2,7	-	-	2,5	3,2
<b>SCL</b>	$t_R$ (min)	15,6	14,4	13,7	13,3	12,9	12,3	11,3	10,5
	$R_S^*$	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,3	1,2

\*Calculada em relação ao pico adjacente de menor tempo de retenção.



**Figura IV.6.** Gráfico do tempo de retenção em função da temperatura para os compostos BZ3, MBC, OCT, PABA, MCE, BMDM, HMS e SCL. Coluna: ACE C18, fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

Os cromatogramas e os valores da Tabela IV.2 revelam que a temperatura exerce grande influência no tempo de retenção e na resolução, principalmente dos compostos mais retidos. Em temperaturas de 30 °C ou mais, os compostos MCE e BMDM tendem a coeluir, perdendo resolução do sistema cromatográfico. Isso pode gerar uma falsa identificação dos compostos ativos presentes em uma formulação fotoprotetora. Nas condições avaliadas, uma separação completa dos compostos, com resolução acima de 1,5, só foi possível nas temperaturas de 20 a 25 °C.

### **IV.3. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA**

A maioria dos trabalhos da literatura adota como preparo de amostra para formulações fotoprotetoras a simples diluição da amostra em solventes como etanol (CHISVERT *et al.*, 2001a; CHISVERT *et al.*, 2001b; DENCAUSSE *et al.*, 2008), metanol (DE ORSI *et al.*, 2006; SIMEONI *et al.*, 2005; RASTOGI & JENSEN, 1998) e metanol/acetonitrila (SMYRNIOTAKIS & ARCHONTAKI, 2004). Como referência, os testes iniciais de preparo de amostra para a extração dos ingredientes ativos das loções fotoprotetoras foram baseados nas condições descritas por Ribeiro (2004). A avaliação do tipo de solvente utilizado neste trabalho levou em consideração a melhor eficiência de extração e o uso da centrífuga foi testado, a fim de se obter uma solução final mais límpida e livre de compostos que possam causar um maior desgaste da coluna cromatográfica.

Cabe ressaltar que, uma vez que não existe amostra branco disponível, foi necessário se avaliar o preparo de amostras com uma amostra comercial. Como critério foi levado em consideração o maior valor do analito determinado (que representaria uma melhor extração) e menor presença de interferentes nos cromatogramas. As amostras escolhidas foram A e B (FPS 15).

A Tabela IV.3 mostra os resultados obtidos para as amostras A e B, bem como as condições de preparo de amostra que estão sendo avaliadas nesse tópico.

**Tabela IV.3.** Condições de preparo de amostras e resultados médios obtidos (n= 2) para as amostras.

Amostra	Preparo de amostra	Resultados, % m/m			
		BZ3	OCT	BMDM	SCL
A	Solvente: <b>MeOH</b>	1,41	0,71	0,88	1,77
	Solvente: <b>MeOH</b> <b>Centrifugação</b>	1,45	0,74	0,92	1,84
	Solvente: <b>EtOH</b>	1,38	0,62	0,81	1,75
B	Solvente: <b>MeOH</b>	-	6,32	0,93	-
	Solvente: <b>MeOH</b> <b>Centrifugação</b>	-	6,38	0,90	-
	Solvente: <b>EtOH</b>	-	6,77	0,82	-

Comparando-se por teste “t” os resultados obtidos para as amostras dissolvidas em metanol com as amostras dissolvidas em metanol com uso de centrifugação verifica-se que não há diferença significativa ( $p = 0,05$ ) entre os valores dos compostos determinados. Entretanto, os resultados obtidos para a extração com metanol e etanol, para a amostra A, diferem significativamente ( $p = 0,05$ ). Com base nesses resultados e levando em consideração que o metanol é o solvente principal da fase móvel, optou-se por realizar as extrações dos compostos das formulações fotoprotetoras com metanol.

Nos cromatogramas, não houve a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos em ambos solventes de extração avaliados. No entanto, foi verificado que a centrifugação permite a obtenção de uma solução final sem partículas em dispersão e, portanto, esse procedimento foi adotado para as análises das amostras.

## **IV.4. VALIDAÇÃO**

### **IV.4.1. LINEARIDADE, FAIXA DE APLICAÇÃO E SENSIBILIDADE**

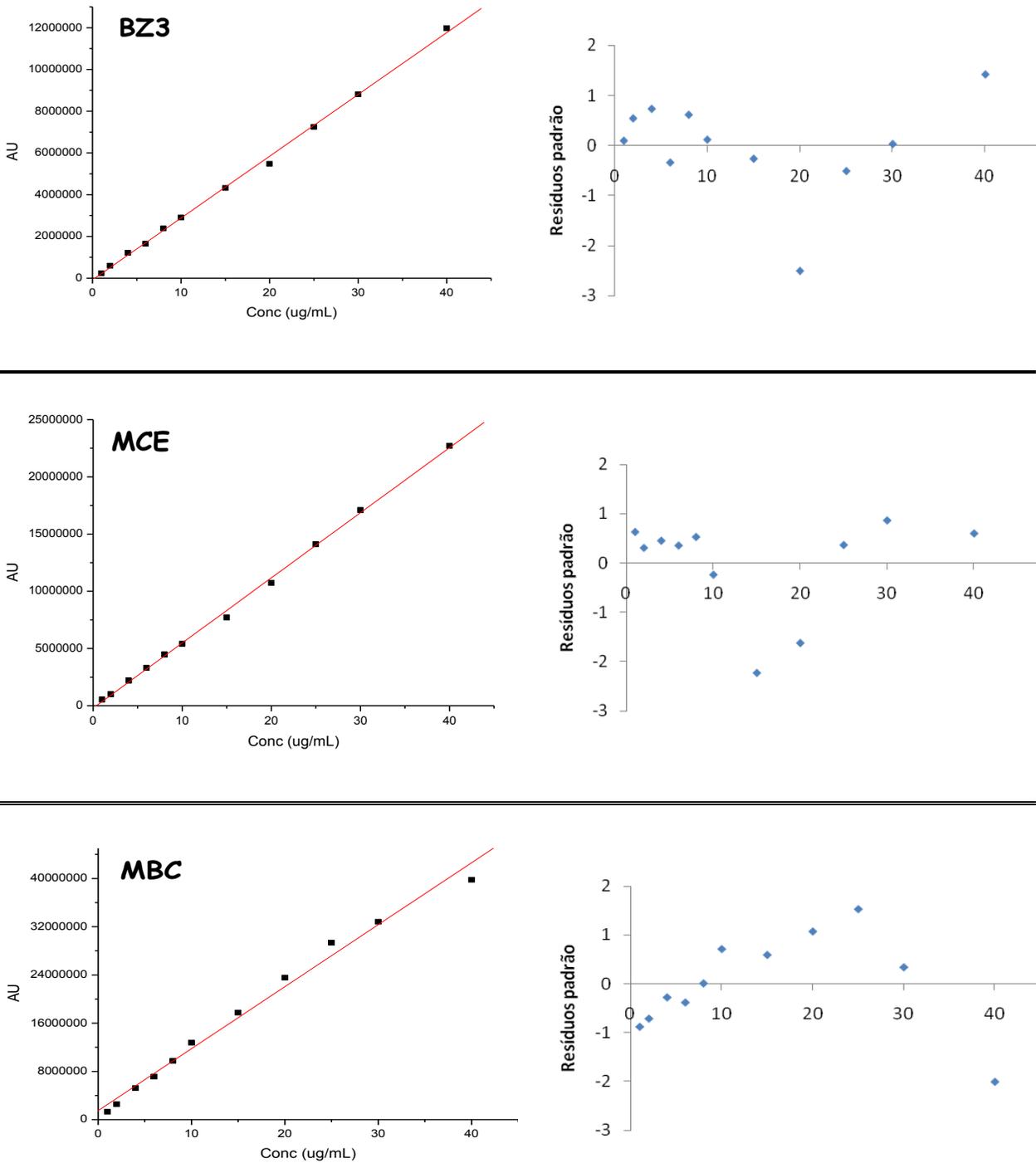
A linearidade corresponde à capacidade de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos na amostra dentro de uma determinada faixa. Matematicamente a linearidade é dada pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ), calculado a partir dos pontos experimentais da curva. Quanto mais próximo de 1,0 for o  $r$ , menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). A aceitação do coeficiente de correlação deve ser um critério obtido pelo grupo de confiabilidade, assim como o número de decimais a ser utilizado. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

A faixa de aplicação do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear (BRITO *et al.*, 2003).

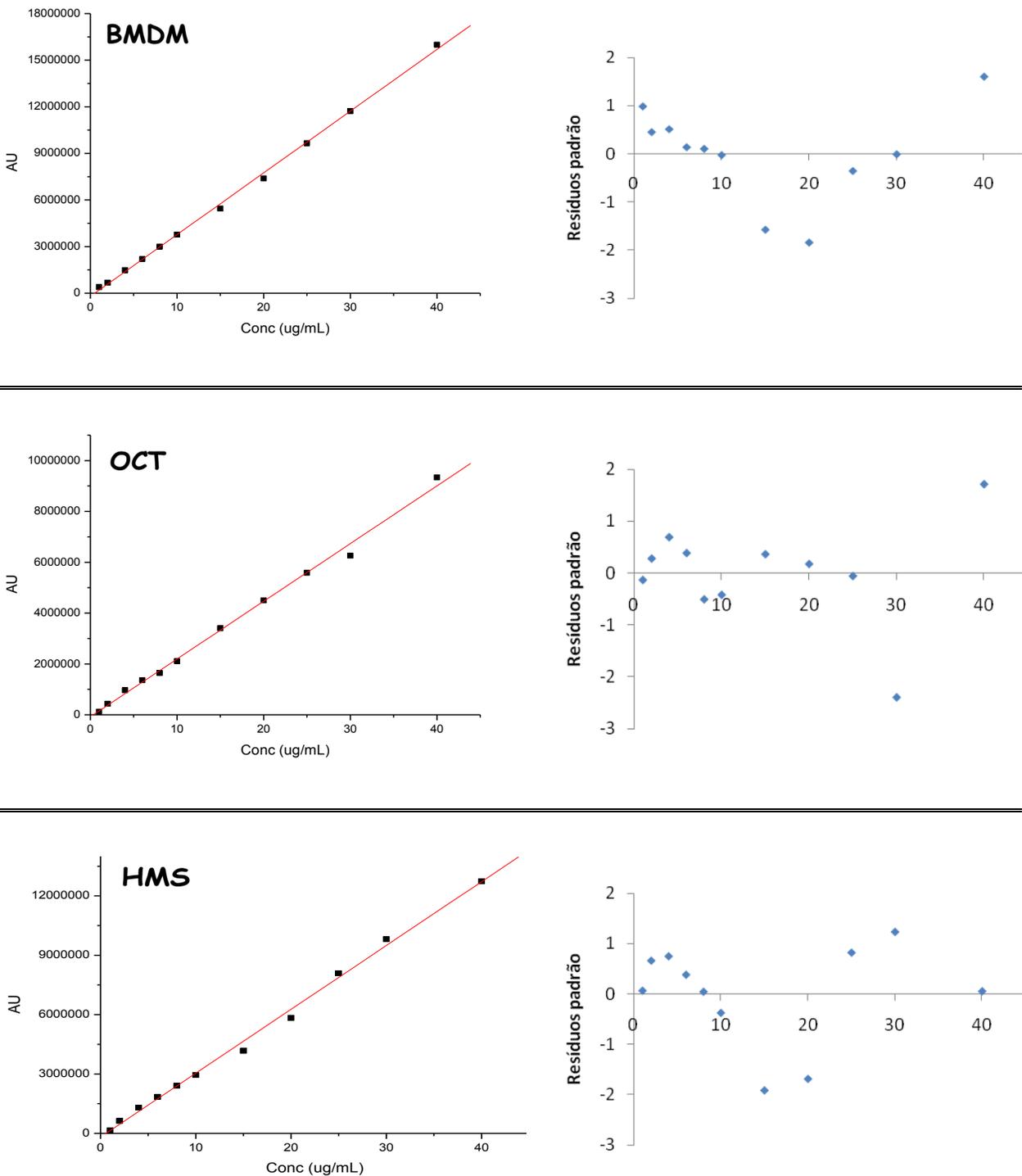
A sensibilidade de um método corresponde à variação de unidade de resposta do método em função da variação da concentração do analito. É a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui a inclinação da curva analítica, ou seja, seu coeficiente angular. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito (BRITO *et al.*, 2003).

Para verificar a adequação do ajuste da reta, construiu-se o gráfico dos resíduos padronizados: dados experimentais *versus* resíduos padronizados. Considera-se que o modelo está bem ajustado, para um nível de confiança de 95%, se os pontos estiverem distribuídos no intervalo entre -2 e 2.

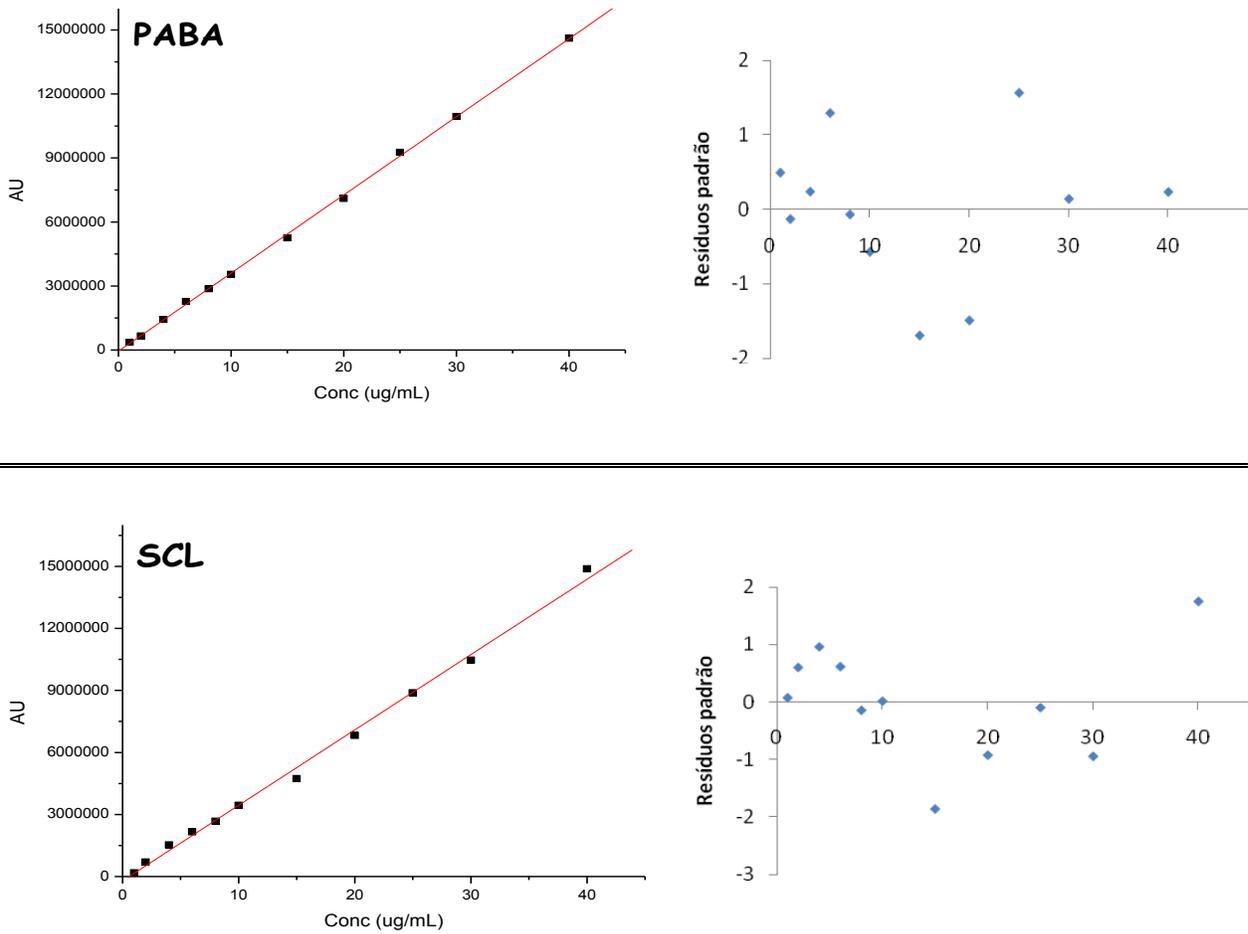
As curvas analíticas para os compostos filtros solares em estudo em solvente e seus respectivos gráficos de resíduos são mostrados nas Figuras IV.7a, IV.7.b e IV.7.c. Os parâmetros obtidos pela curva analítica, isto é, os coeficientes de correlação, a faixa de aplicação e a sensibilidade são mostrados na Tabela IV.4.



**Figura IV. 7.a.** Curvas analíticas dos compostos BZ3, MCE e MBC na faixa de concentração de 1 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os respectivos gráficos de resíduos.



**Figura IV. 7.b.** Curvas analíticas dos compostos BMDM, OCT, HMS na faixa de concentração de 1 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os respectivos gráficos de resíduos.



**Figura IV. 7.c.** Curvas analíticas dos compostos PABA e SCL na faixa de concentração de 1 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os respectivos gráficos de resíduos.

**Tabela IV.4.** Parâmetros da curva analítica

Parâmetros	BZ3	OCT	MBC	PABA	MCE	BMDM	HMS	SCL
<b>Faixa Linear</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0	1,0-40,0
<b>Linearidade</b>	0,9994	0,9977	0,9943	0,9997	0,9993	0,9993	0,9981	0,9981
<b>Sensibilidade</b> ( $\mu\text{A}^* / \mu\text{g mL}^{-1}$ )	$2,96 \cdot 10^5$	$2,27 \cdot 10^5$	$1,03 \cdot 10^5$	$3,66 \cdot 10^5$	$5,69 \cdot 10^5$	$3,97 \cdot 10^5$	$3,23 \cdot 10^5$	$3,65 \cdot 10^5$

Os coeficientes de correlação foram próximos da unidade para todos os compostos e, portanto existe uma relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta de detecção.

Os gráficos de resíduos mostram que, de modo geral, os resíduos encontram-se no intervalo aceitável. Além disso, os pontos estão distribuídos aleatoriamente e, portanto, não há uma tendência nas dispersões.

#### IV.4.2. PRECISÃO

Precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Usualmente, é expressa como a estimativa do desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas. O CV é dado pela equação I.4 (BRITO *et al.*, 2003):

$$\text{CV (\%)} = s/m \times 100 \quad (\text{I.4})$$

Na qual  $s$  é a estimativa do desvio-padrão absoluto das medidas e  $m$  é a média das medidas.

Para a validação de métodos em um único laboratório (“*single-laboratory validation*”), duas etapas são relevantes para esse parâmetro:

- Precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante uma única corrida analítica;
- Precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes corridas analíticas.

Neste trabalho foram avaliadas as precisões intra- e inter-ensaio. A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise em quintuplicata de uma mesma amostra, em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. As amostras empregadas foram: amostra B com FPS 20 para avaliar a precisão em relação aos compostos OCT e BMDM e a amostra J com FPS 30 para avaliar a precisão em relação aos compostos BZ3, MCE, HMS, SCL. Os compostos PABA e MBC, que não estavam presente na formulação, foram adicionados à amostra J antes de seu preparo. A precisão intra-ensaio foi expressa pelo coeficiente de variação obtida nas cinco determinações.

A precisão inter-ensaio foi determinada pela análise das mesmas amostras descritas anteriormente, no entanto, as análises foram realizadas em três dias diferentes, usando o mesmo equipamento e realizadas pelo mesmo analista. No primeiro dia as amostras foram analisadas em quintuplicata e nos dois dias subsequentes em triplicata. A precisão inter-ensaio foi expressa pelo coeficiente de variação obtida nos três dias diferentes (n=11).

A Tabela IV.5 apresenta os valores de precisão intra e inter-ensaio dos filtros solares avaliados.

A quantificação foi realizada por padronização externa, usando, para tanto, as curvas analíticas no solvente.

**Tabela IV.5.** Resultados da precisão intra e inter-ensaio.

	OCT	BMDM	BZ3	MBC	PABA	MCE	HMS	SCL
<b>RSD (%) intra – ensaio (n= 5)</b>	1,25	1,35	1,43	3,68	1,75	1,97	1,09	0,57
<b>RSD (%) inter – ensaio (n=11)</b>	0,96	3,72	1,51	2,69	2,58	1,55	1,79	1,43

Não são considerados aceitáveis valores do coeficiente de variação superiores a 5%, segundo a Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). Os resultados mostram que o método apresenta uma precisão adequada ao objetivo que se propõe, com as estimativas dos desvios padrão relativos variando entre 0,57-3,68% e 0,96 – 3,72% para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente.

### IV.4.3. EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (ANVISA, 2003).

Os quatro métodos principais para o estudo da exatidão são:

- Uso de material de referência certificado (MRC);
- Comparação do método proposto com um método de referência;
- Uso de ensaios de recuperação na matriz;
- Estudos colaborativos.

Os MRC (quando disponíveis) são os materiais de controle preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado (BRITO *et al.*, 2003).

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (BRITO *et al.*, 2003).

Estudos colaborativos implicam na aceitação de pelo menos oito laboratórios (número mínimo) em desenvolver determinado método. Somente quando for impossível reunir tal número de laboratórios, o estudo poderá ser conduzido com o mínimo absoluto de cinco participantes (BRITO *et al.*, 2003).

O ensaio de recuperação, que foi utilizado neste trabalho, constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo (BRITO *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que foi necessário se trabalhar com a fortificação da amostra pois não existe matriz branco para esse tipo de amostra.

Para avaliar a exatidão, fez-se a fortificação a um nível de 50 % da amostra B (FPS 20) para avaliar a exatidão em relação aos compostos OCT e BMDM e da amostra J (FPS 30) para avaliar a exatidão em relação aos compostos BZ3, MCE, HMS e SCL. Os compostos PABA e MBC que não estavam presentes nas formulações avaliadas foram adicionados à amostra J antes de seu preparo. As análises foram realizadas em quintuplicata. O valor da recuperação em relação ao padrão adicionado foi calculado pela equação I.5.:

$$\text{Rec (\%)} = \text{valor obtido} / \text{valor adicionado} \times 100 \quad (I.5)$$

Os resultados de recuperação e suas estimativas de desvio são mostrados na Tabela IV.6. Como critério de aceitação foi considerado uma recuperação média entre 95 a 105 %.

**Tabela IV.6.** Resultados de recuperação e as estimativas dos desvios padrão relativos.

	OCT	BMDM	BZ3	MBC	PABA	MCE	HMS	SCL
<b>Recuperação (%) (n = 5)</b>	112	103	101	95	100	100	105	104
<b>RSD (%)</b>	1,27	1,31	2,66	1,54	1,28	2,51	2,49	1,88

Os dados obtidos mostram que o valor de recuperação para o OCT (112%) não atende os critérios adotados. A recuperação acima do valor aceitável pode ser explicado por um efeito matriz. Para avaliar essa hipótese foi necessário se realizar a análise desta amostra pelo método de adição de padrão.

O método de adição de padrão consistiu em adicionar quantidades conhecidas do composto OCT (0, 15, 30, 45 e 60%) a uma quantidade conhecida de amostra antes do seu preparo. Os pontos foram preparados em triplicata. Construiu-se então uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas correspondeu à área do pico do composto OCT, sem qualquer adição do padrão. A concentração do composto na amostra foi obtida pela extrapolação da reta no eixo das abcissas (RIBANI *et al.*, 2004).

Os resultados da porcentagem do composto OCT calculados pela curva de adição de padrão estão apresentados na Tabela IV.7.

**Tabela IV.7.** Resultados da porcentagem de OCT na amostra calculados pela curva de adição de padrão.

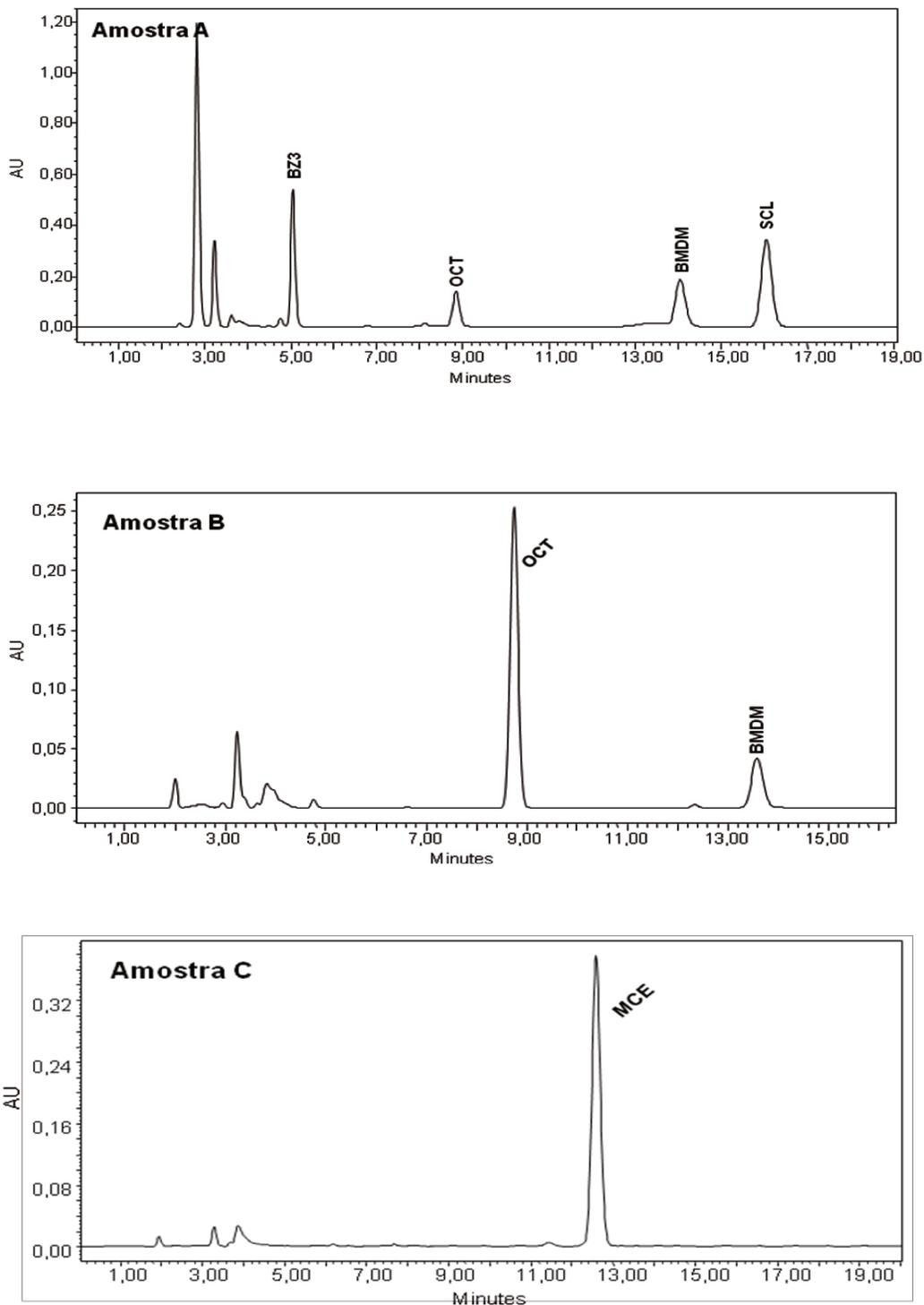
	OCT
Resultado na amostra (média, n=3) (%)	8,81
RSD (%)	6,07

O resultado do composto OCT na amostra obtido pela curva de adição de padrão apresenta uma diferença de +10% em relação ao resultado obtido pela padronização externa, que foi de 8,01%. Isso significa que o efeito matriz existe para esse composto e, portanto, para a determinação do mesmo nesta formulação, deve-se empregar o método de adição padrão ou corrigir o resultado final.

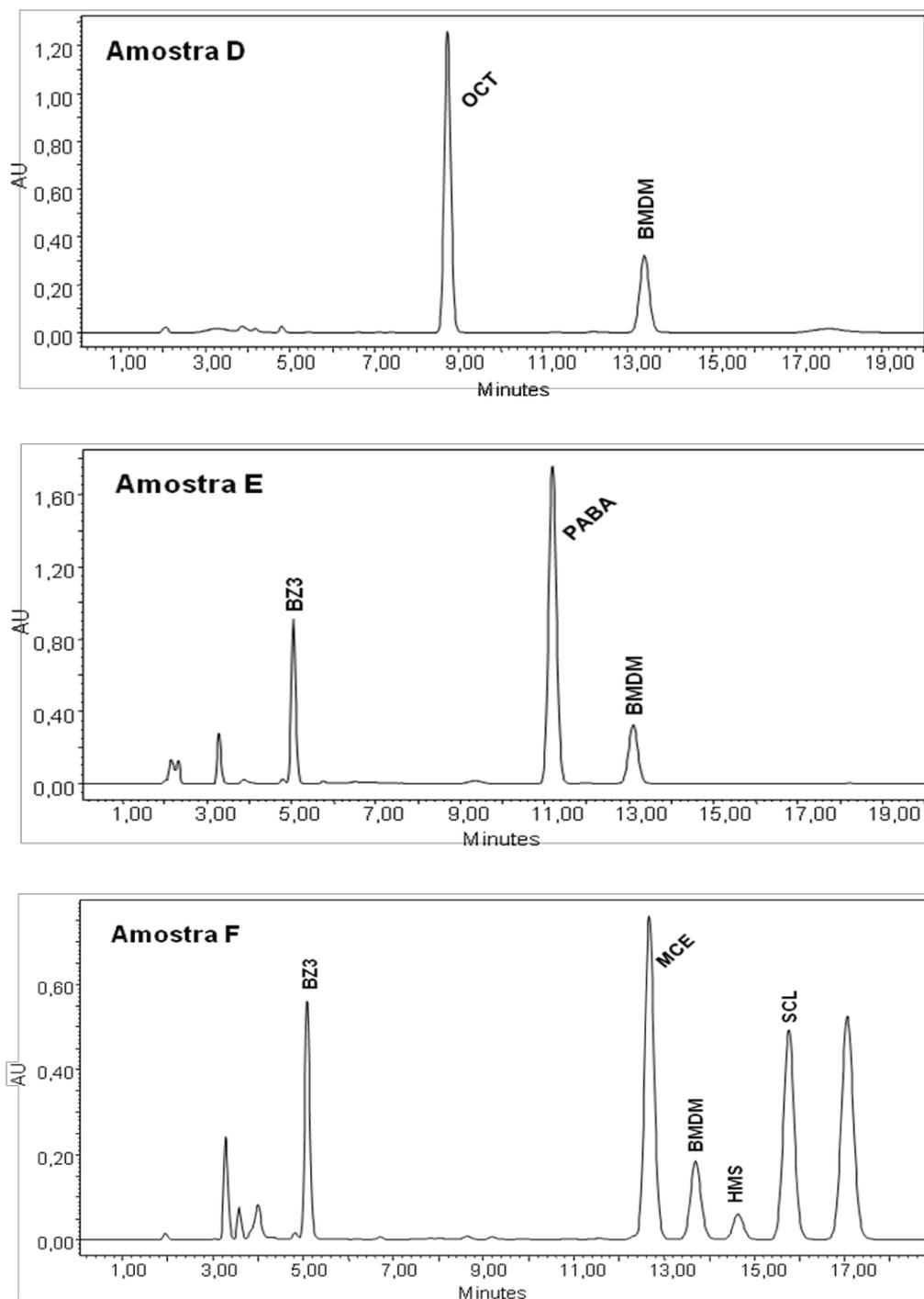
#### **IV.5. ANÁLISE DE AMOSTRAS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE**

Após validado o método cromatográfico, o mesmo foi empregado na análise de 10 amostras comercializadas no Brasil e 3 amostras comercializadas na Alemanha. O país de fabricação das mesmas e os compostos ativos que estão presentes em cada uma, de acordo com o rótulo, são mostrados na Tabela III.3.

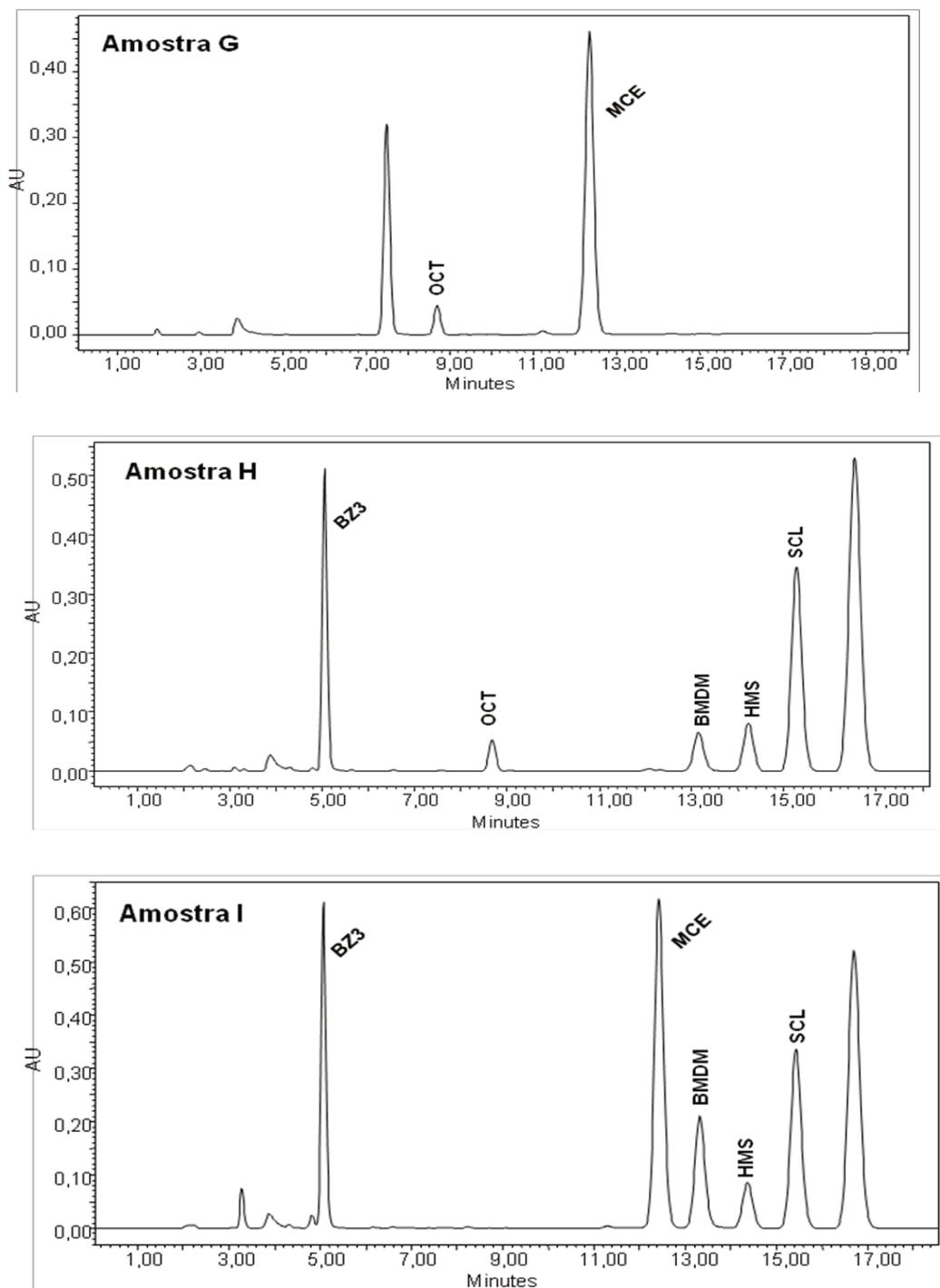
Os cromatogramas obtidos para as amostras analisadas são apresentados nas Figuras IV.8.a, IV.8.b, IV.8.c, IV.8.d e IV.8.e.



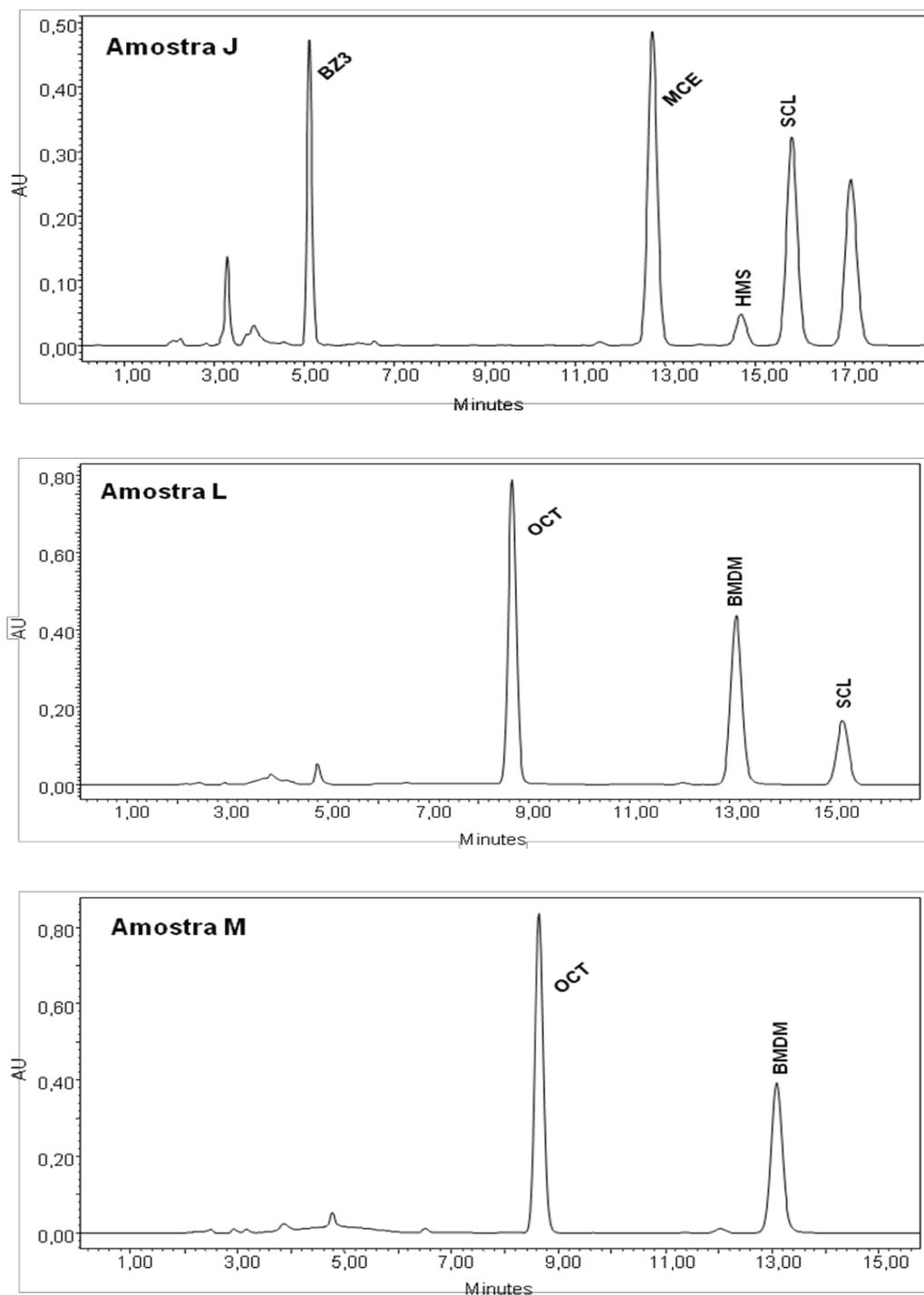
**Figura IV.8.a.** Cromatogramas obtidos para as amostras A, B e C. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto.



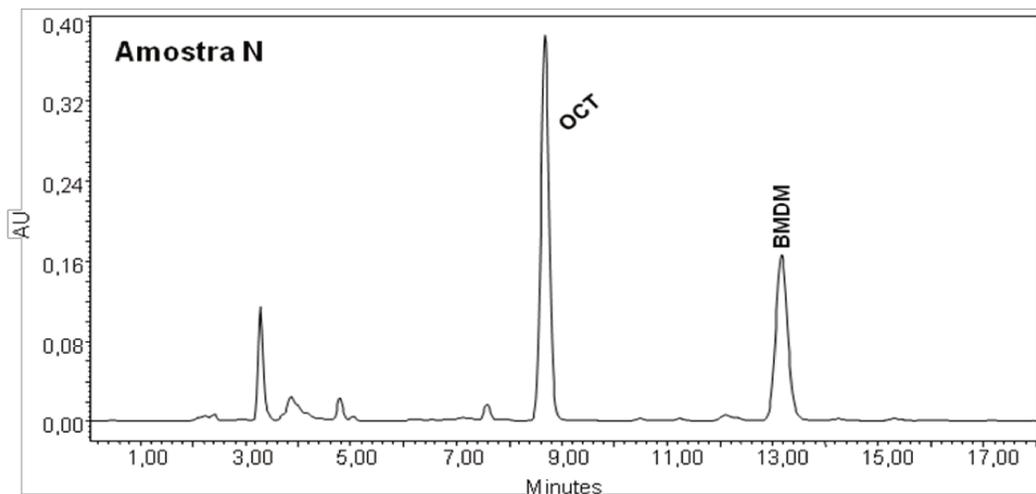
**Figura IV.8.b.** Cromatogramas obtidos para as amostras D, E e F. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto.



**Figura IV.8.c.** Cromatogramas obtidos para as amostras G, H e I. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto.



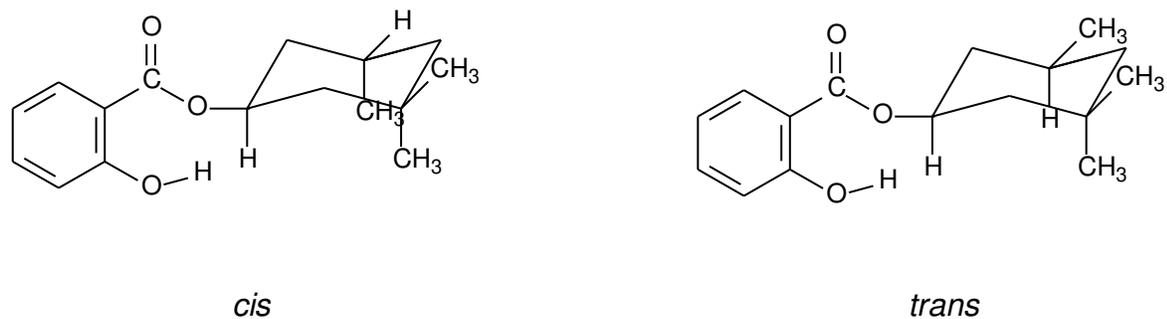
**Figura IV.8.d.** Cromatogramas obtidos para as amostras J, L e M. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto.



**Figura IV.8.e.** Cromatogramas obtidos para a amostra N. Coluna ACE C18, fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e temperatura ambiente. Comprimento de onda de detecção: máximo de cada composto.

Os cromatogramas de algumas formulações (amostras F, H, I e J) apresentam um pico no tempo de retenção de aproximadamente 16,5 minutos. Com base nos espectros e na literatura, sugere-se que esse pico é referente ao composto homosalato. Esse composto tem uma unidade de nove carbonos ligados ao ácido carboxílico da molécula de salicilato. No entanto, essa unidade de nove carbonos, chamada de homomentila ou 3,3,5-trimetilcicloexila pode existir em duas formas isoméricas, *cis* e *trans* (Figura IV.9). A maioria dos homosalatos disponíveis comercialmente para preparo de formulações fotoprotetoras é uma mistura dos dois isômeros. Misturas típicas contem 15 % do isômero *cis* e 85 % do isômero *trans*, embora misturas de 40 % *cis* e 60 % *trans* tenham sido reportadas (LOWE *et al.*, 1997).

Muito provavelmente o composto que elui em 16,5 minutos é o isômero do homosalato. Para confirmar a identidade seria necessário empregar a espectrometria de massas.



**Figura IV.9.** Estrutura dos isômeros *cis* e *trans* do composto homosalato.

Os resultados das amostras analisadas são mostrados na Tabela IV.8.

**Tabela IV.8.** Resultados médios dos princípios ativos e estimativas do desvio padrão relativo das amostras analisadas.

Am.	FPS	Conc. Média, % (n = 3)							
		BZ3	MBC	OCT	PABA	MCE	BMDM	HMS*	SCL
<b>A</b>	15	1,44	-	0,74	-	-	0,83	-	1,85
	RSD (%)	0,92	-	2,30	-	-	2,81	-	1,76
	30	1,98	-	2,31	-	-	2,60	-	2,95
	RSD (%)	0,21	-	0,39	-	-	0,43	-	0,29
	50	3,91	-	2,23	-	-	2,60	-	4,71
	RSD (%)	0,43	-	1,42	-	-	1,77	-	1,17
	60	3,67	-	2,10	-	-	2,39	-	4,26
	RSD (%)	2,76	-	4,90	-	-	3,95	-	1,15
<b>B</b>	8	-	-	2,84	-	-	0,42	-	-
	RSD (%)	-	-	0,20	-	-	1,71	-	-
	15	-	-	6,66	-	-	0,93	-	-
	RSD (%)	-	-	0,97	-	-	0,37	-	-
	20	-	-	7,67	-	-	1,31	-	-
	RSD (%)	-	-	2,97	-	-	4,21	-	-
	30	-	-	6,70	-	-	2,07	-	-
	RSD (%)	-	-	1,26	-	-	0,72	-	-
	40	-	-	9,44	-	-	2,89	-	-
	RSD (%)	-	-	0,74	-	-	0,44	-	-
<b>C</b>	60	-	-	9,59	-	-	2,13	-	-
	RSD (%)	-	-	2,26	-	-	3,54	-	-
<b>D</b>	30	-	-	-	-	5,62	-	-	-
	RSD (%)	-	-	-	-	1,90	-	-	-
<b>E</b>	30	-	-	9,56	-	-	2,26	-	-
	RSD (%)	-	-	1,31	-	-	2,60	-	-
<b>E</b>	30	3,07	-	-	7,87	-	1,81	-	-
	RSD (%)	1,82	-	-	0,51	-	1,60	-	-

cont. **Tabela IV.8.** Resultados médios dos princípios ativos e estimativas do desvio padrão relativo das amostras analisadas.

Am.	FPS	Conc. Média, % (n = 3)							
		BZ3	MBC	OCT	PABA	MCE	BMDM	HMS*	SCL
F	30	2,97	-	-	-	5,59	1,65	0,63/6,19	4,62
	RSD (%)	1,28	-	-	-	1,38	1,45	0,92/2,29	1,65
G	30	-	-	0,94	-	7,03	-	-	-
	RSD (%)	-	-	1,44	-	1,31	-	-	-
H	30	3,92	-	0,80	-	-	0,89	1,28/9,67	4,94
	RSD (%)	0,10	-	1,23	-	-	1,21	2,84/2,37	0,98
I	30	4,92	-	-	-	7,35	2,76	1,42/9,74	5,02
	RSD (%)	1,19	-	-	-	1,53	0,32	0,92/1,21	1,81
J	30	3,97	-	-	-	6,00	-	0,83/4,94	5,07
	RSD (%)	1,46	-	-	-	1,97	-	0,55/1,27	0,57
L	30	-	-	9,59	-	-	4,46	-	1,93
	RSD (%)	-	-	2,97	-	-	3,92	-	4,79
M	30	-	-	9,97	-	-	3,87	-	-
	RSD (%)	-	-	3,77	-	-	0,40	-	-
N	30	-	-	9,45	-	-	3,48	-	-
	RSD (%)	-	-	1,67	-	-	3,99	-	-

\* Resultados referentes aos dois isômeros do composto HMS.

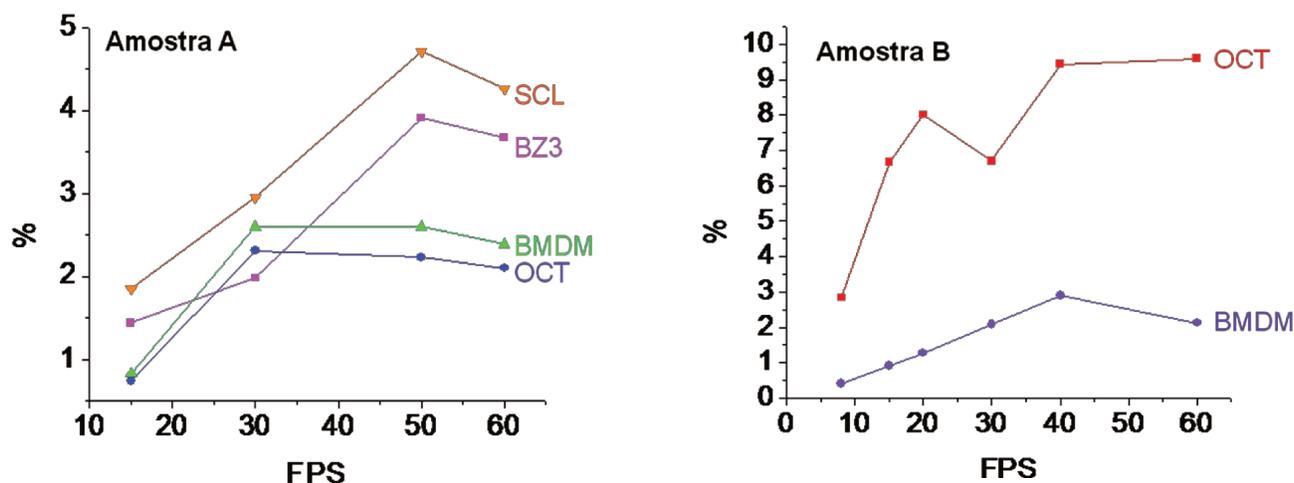
A legislação brasileira não admite valores de RSD superiores a 5 % (Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003, ANVISA) e os resultados apresentados para as amostras analisadas mostraram valores de RSD variando entre 0,1 - 4,9 %.

As concentrações máximas de filtros solares permitidas pela ANVISA (resolução RDC nº 47 de 2006) são mostradas na Tabela IV.9. Os compostos identificados em todas as amostras estão de acordo com o especificado no rótulo e suas concentrações estão dentro do limite máximo permitido pela legislação.

**Tabela IV.9.** Concentração máxima dos filtros solares permitida em formulações fotoprotetoras comercializadas no Brasil.

<b>Composto</b>	<b>Concentração máxima permitida (ANVISA, RDC nº 47 de 2006) (%)</b>
BZ3	10
MBC	4
OCT	10
PABA	8
MCE	10
BMDM	5
HMS	15
SCL	5

Os resultados das amostras A e B, que foram analisadas para todos os FPS disponíveis, mostram que há uma tendência de incremento de concentração dos compostos ativos com o aumento do FPS, embora essa tendência não seja uma regra. Para FPS acima de 30 não se verifica uma grande variação na concentração de um mesmo filtro químico. Cabe destacar, que além dos filtros químicos também são adicionados filtros físicos. Os gráficos de concentração dos ingredientes ativos em relação ao FPS para as amostras A e B são apresentados na Figura IV.10.



**Figura IV.10.** Gráfico de concentração dos filtros solares em função do FPS para as amostras A e B.

#### IV.6. DETERMINAÇÃO DO FPS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Nesse trabalho, avaliou-se a potencialidade da técnica de fluorescência de raios-X (FRX) aliada a quimiometria para determinar o FPS de protetores solares.

A técnica de FRX já está bem consolidada quando aplicada a determinações inorgânicas, ou seja, a elementos cuja absorção dos raios-X apresenta valores significativos. No entanto, nos últimos anos, a aplicação de FRX vem ganhando destaque em estudos de amostras orgânicas, nas quais a radiação é intensamente dispersada (espalhada) e não apenas absorvida.

Por apresentarem pequenas variações entre amostras, esses efeitos de espalhamento eram considerados perturbações. Hoje, com o auxílio de ferramentas quimiométricas, esses efeitos revelam propriedades importantes das amostras, já que a região de espalhamento da FRX é dependente de várias características das amostras como composição, estruturas dos compostos e concentração relativas dos componentes.

Diversos são os métodos estatísticos usados no tratamento dos dados multivariados. Neste trabalho foram empregados o PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*) e a regressão por quadrados mínimos parciais, o PLS (do inglês, *Partial Least Squares*).

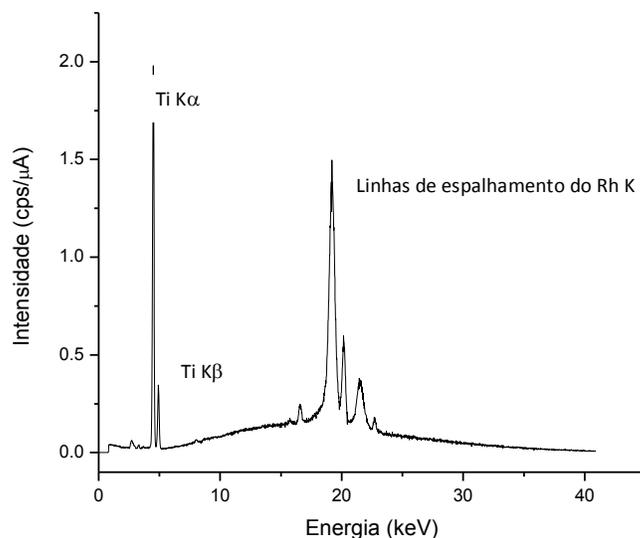
A análise por componentes principais é um método de agrupamento que, além de reduzir a dimensionalidade da matriz de dados, permite verificar a existência de amostras anômalas e as de maior importância, eliminar ruídos experimentais, classificar as amostras e/ou agrupá-las conforme suas semelhanças, entre outros. A sua aplicação implica em decompor a matriz de dados ( $\mathbf{X}$ ) em duas outras matrizes: a de scores ( $\mathbf{T}$ ), que expressa a relação entre as amostras e a de loadings transposta ( $\mathbf{P}'$ ), que expressa a relação entre as variáveis identificando o quanto cada uma delas contribuiu na formação das componentes principais (FERREIRA *et al.*, 1999).

Entre os métodos quantitativos para análise de dados multivariados destaca-se o PLS. Modelos obtidos por PLS tendem a ser robustos, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração. No presente trabalho a regressão PLS estabeleceu uma relação quantitativa entre o conjunto das respostas instrumentais e o fator de proteção solar, desenvolvendo um modelo matemático que correlaciona estas informações.

Para avaliar a potencialidade da técnica de fluorescência de raios-X para determinar o FPS de formulações fotoprotetoras, foi empregada a amostra B de FPS 8, 15, 20, 30, 40 e 60. Essa amostra foi selecionada pois era a que mais tinha disponibilidade de FPS além de ser a única que apresentava a mesma composição, entre ingredientes ativos e outros ingredientes, para todos os FPS.

Para desenvolver um modelo robusto por PLS utiliza-se normalmente um mínimo de 20 amostras, portanto foi necessário preparar formulações com outros FPS por diluição das formulações pré-existentes. Para tanto, foram empregadas as amostras B FPS 8 e FPS 60 e prepararam-se amostras com FPS 10, 12, 13, 17, 21, 23, 25, 31, 33, 35, 37, 41, 43, 45, 47, 53, 55 e 57. Essas amostras não sofreram nenhum tipo de tratamento.

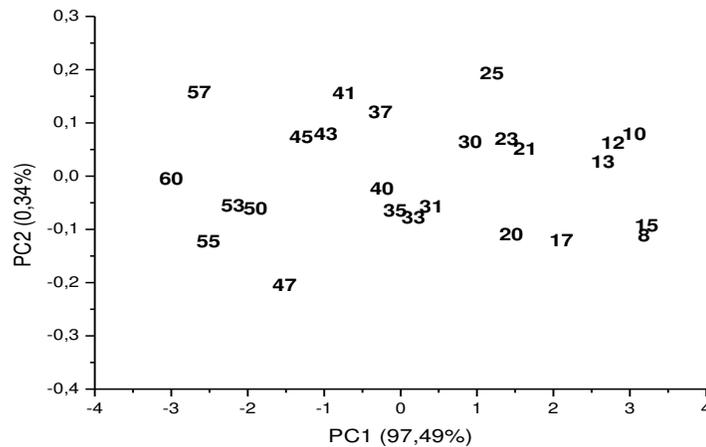
Foram obtidos os espectros de raios-X em duplicata para cada formulação e o espectro característico obtido para a amostra B é mostrado na Figura IV.11, onde é possível observar apenas o pico relacionado ao titânio (Ti), presente em todas as formulações analisadas.



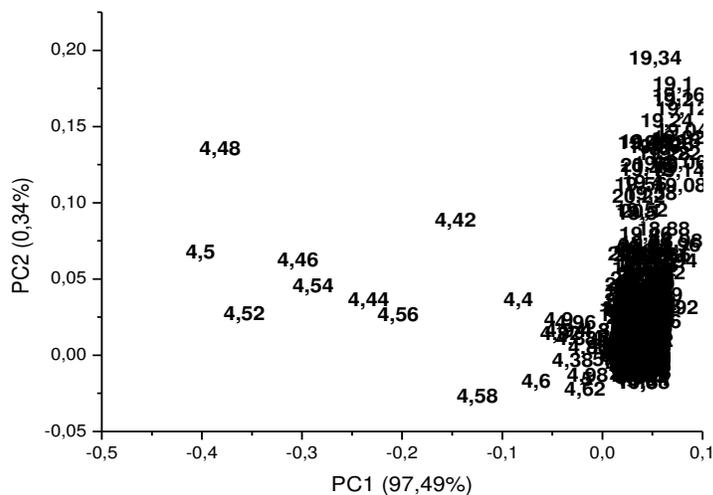
**Figura IV.11.** Espectro de raios X da amostra B com FPS 20.

Para a análise multivariada, foi obtida a matriz de dados (tabela de dados), chamada de X, com as variáveis independentes (amostras) nas linhas e as variáveis dependentes (medidas) nas colunas. O pré-processamento utilizado envolveu a centragem dos dados na média. Os espectros não sofreram qualquer tipo de transformação.

Os espectros de raios X de todas as amostras foram tratados com a ferramenta quimiométrica PCA. A Figura IV.12 mostra o gráfico de scores (amostras) entre as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), que explicaram 97,8% da variância, e a Figura IV.13 mostra o gráfico de loadings (variáveis).



**Figura IV.12.** Gráfico de scores para o conjunto de amostras obtido para PC1 x PC2.



**Figura IV.13.** Loadings para o conjunto de amostras obtido para PC1.

O gráfico de scores da análise de componentes principais não permite observar uma separação das amostras, mas mostra uma tendência das mesmas a se alinharem ao longo da PC1 de acordo com o FPS. Comparando o gráfico de scores com o gráfico de loadings, pode-se observar que as faixas espectrais próximas de 4,5 keV (Ti  $K\alpha$ ), relacionadas ao titânio (dióxido de titânio, presente na amostra B), foram as principais

faixas que influenciaram esse efeito, sendo, em segundo lugar, com 0,34% da variância explicada na PC2, a região de espalhamento das linhas K do tubo de raios-X de ródio (entre 18 e 22 keV).

Foi verificada a possibilidade de construção de um modelo de calibração, aplicando-se PLS. Para isso, foram selecionadas aleatoriamente 80% das amostras do conjunto total. Os outros 20% das amostras foram utilizados para validação externa do modelo. Os valores de FPS utilizados como esperados foram os fornecidos pelo rótulo do produto.

Antes da construção do modelo, a ausência de outliers (amostras anômalas) foi verificada pela relação entre os parâmetros resíduo Student e a leverage.

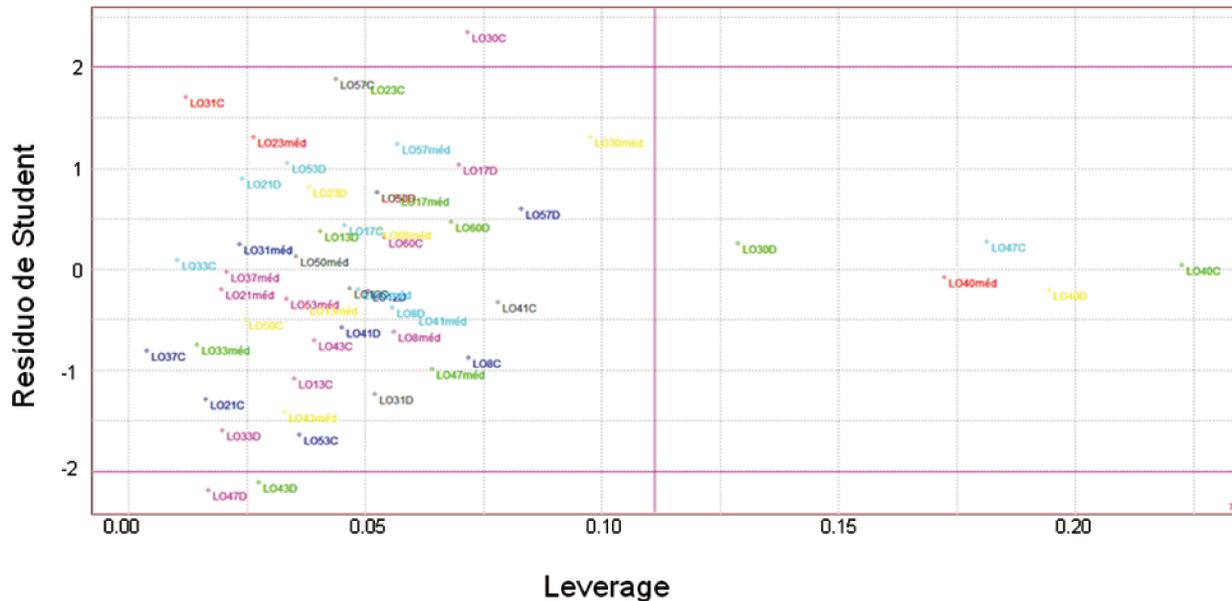
A "leverage" é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de "leverage" pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro lado, se as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma grande influência no modelo, que pode ser negativa (FERREIRA *et al.*, 1999).

Os resíduos correspondem aos desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo. Valores de resíduos altos significam que o modelo não está conseguindo modelar os dados de forma adequada. O resíduo de Student é utilizado para se obter a influência de cada amostra em particular (BARTHUS *et al.*, 2005).

Supondo que os resíduos são normalmente distribuídos, pode-se aplicar o teste t para verificar se a amostra está ou não dentro da distribuição com um nível de confiança de 95%. Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de  $\pm 2,5$  são considerados altos. A análise do gráfico dos resíduos de Student versus leverage para cada amostra é a melhor maneira de se determinar as amostras anômalas. Amostras com altos resíduos e pequenos valores de leverage provavelmente apresentam algum erro no valor da concentração que deve de preferência ser medida novamente ou então esta amostra é simplesmente excluída. Amostras com altos resíduos e altas leverages correspondem certamente à

amostras anômalas e devem ser retiradas do modelo de calibração (BARTHUS *et al.*, 2005).

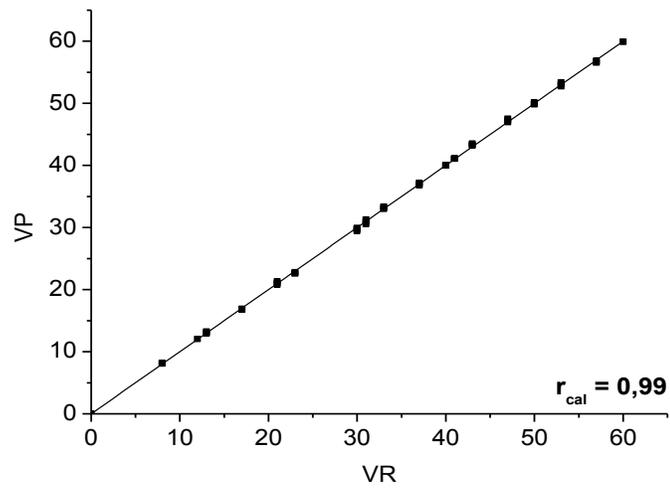
A Figura IV.14 mostra a relação entre o resíduo Student e leverage considerando o conjunto total de amostras e 3 variáveis latentes.



**Figura IV.14.** Relação gráfica para cada amostra entre o resíduo Student e leverage considerando todas as amostras e 3 variáveis latentes.

Segundo a relação entre resíduo Student e leverage, não há nenhuma amostra anômala que deve ser excluída na construção do modelo de calibração.

A relação entre os valores previstos (VP) e os valores de referência (VR) (rótulo) para os FPS e o coeficiente de correlação ( $r_{cal}$ ) estão apresentados na Figura IV.15, onde 3 variáveis latentes foram necessárias para a calibração. Os valores VR e VP e seus erros relativos (ER) estão apresentados na Tabela IV.10. Os valores apresentados abaixo são as médias das duas medidas.



**Figura IV.15.** Relação entre os valores VR e VP para o modelo de calibração interna via PLS.

**Tabela IV.10** – Valores VP, VR e erros relativos do modelo de calibração interna via PLS.

<b>Amostra/FPS</b>	<b>VP</b>	<b>VR</b>	<b>ER (%)</b>
8	8,1	8	-1,81
12	12,1	12	-0,39
13	13,1	13	-0,64
17	16,8	16	1,02
21	21,1	21	-0,22
23	22,7	22	1,36
30	29,7	30	1,01
31	30,9	31	0,19
33	33,2	33	-0,54
37	37,0	37	0,02
40	40,0	40	0,04
41	41,1	41	-0,26
43	43,3	43	-0,78
47	47,2	47	-0,49
50	50,0	50	0,06
53	53,1	53	-0,13
57	56,7	57	0,51
60	59,9	60	0,15

Após a construção do modelo de calibração, foi construído o modelo de validação, obtendo-se valores de previsão para amostras externas previamente selecionadas (FPS 10, 25, 35, 45 e 55). Tais amostras foram selecionadas

aleatoriamente e correspondiam a aproximadamente 20% do total de amostras. Os valores VR, VP e ER estão apresentados na Tabela IV.11.

**Tabela IV.11.** Valores VR, VP e ER das amostras externas

<b>Amostra/FPS</b>	<b>VP</b>	<b>VR</b>	<b>ER (%)</b>
10	<b>10,2</b>	10	<b>-2,30</b>
25	<b>25,3</b>	25	<b>-1,04</b>
35	<b>35,8</b>	35	<b>-2,36</b>
45	<b>46,1</b>	45	<b>-2,33</b>
55	<b>55,8</b>	55	<b>-1,45</b>

A ANVISA permite uma variação de 20% na determinação do FPS no teste in vivo (método oficial) em relação ao FPS declarado. Os resultados apresentados tiveram variações entre 1-2%, o que faz do método proposto uma alternativa em potencial ao método convencional para a determinação do FPS de protetores solares.

A principal desvantagem do método por fluorescência de raios-X é o alto custo do equipamento (aproximadamente US\$ 35.000,00). No entanto, a grande vantagem da utilização do método proposto é não se utilizar indivíduos, não expondo os mesmos aos efeitos maléficos da radiação UV. Além disso, o método proposto é muito mais rápido, fato de grande interesse para os laboratórios de rotina de uma maneira geral. Vale lembrar ainda que a técnica de fluorescência de raios-X permite realizar quantificações do conteúdo inorgânico (filtros físicos) das amostras analisadas, que também deve estar dentro do limite máximo exigido pela ANVISA, ampliando as vantagens da aplicação do método proposto em laboratórios de rotina.

Cabe ressaltar, no entanto, que os valores de FPS utilizados para a construção do modelo de calibração e validação provêm do rótulo, ou seja, uma fonte que não foi cientificamente confirmada. Uma análise de FPS das amostras em laboratórios específicos seria necessário para a obtenção do FPS real das amostras, proporcionando maior confiabilidade ao método.

Outra limitação do método proposto é que o mesmo foi calibrado e validado apenas para a um tipo de amostra, isto é, o método só pode ser aplicado com confiança nas amostras B. Uma continuação deste trabalho seria a calibração com várias matrizes diferentes e aplicação para qualquer tipo de formulação fotoprotetora.

---

---

## **V. CONCLUSÕES**

---

---



Mediante avaliação de diferentes fases estacionárias e composição da fase móvel foi possível selecionar as condições cromatográficas para a separação de oito filtros solares que são amplamente empregados em formulações cosméticas, em particular, protetores solares. A fase estacionária que apresentou os melhores resultados para a separação dos compostos foi a coluna cromatográfica ACE<sup>®</sup> 5 C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) com fase móvel composta por metanol:água 88:12 v/v e vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

O preparo de amostra empregando metanol para solubilização seguido por tratamento ultrassônico e centrifugação é eficaz.

O método foi validado de acordo com a Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e mostrou-se simples, rápido, preciso e exato.

Os compostos ativos identificados nas amostras analisadas estão de acordo com o especificado no rótulo das embalagens e as concentrações encontradas estão dentro do limite máximo especificado pela resolução RDC nº 47 de 16 de março de 2006 da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Em relação à determinação do FPS dos protetores solares por fluorescência de raios X aliada à quimiometria, os resultados mostraram um modelo eficiente, indicando a potencialidade do método como alternativa ao método convencional. Os erros de previsão externa foram inferiores aos exigidos atualmente pela legislação (20%). Embora exija um alto custo de implementação, o método proposto tem as vantagens de ser rápido, não ter preparo de amostra e não ter a necessidade de voluntários, evitando a exposição de indivíduos à radiação UV.



---

---

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, RE n° 889, de 29 de maio de 2003: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>, acessado em agosto de 2009.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**, RDC n° 47 de 16 de março de 2006: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word>, acessado em novembro de 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos**, RDC n° 237, de 22 de agosto de 2002: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/237\\_02rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/237_02rdc.pdf), acessado em novembro de 2008.

AZZELLINI, S.C., **Agentes potencializantes de fotoprotetores**, *Cosmetic & Toiletries*, **1995**, 7, 34-37.

BARON, E.D.; STEVENS, S.R., **Sunscreens and immune protection**, *British Journal of Dermatology*, **2002**, 146, 933-937.

BARTHUS, R.C.; MAZO, L.H.; POPPI, R.J., **Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada**, *Eclética Química*, **2005**, 30 (4), 51-58.

BENDOVÁ, H.; AKRMAN, J.; KREJCI, A.; KUBÁČ, L.; JÍROVÁ, D.; KEJLOVÁ, K.; KOLÁROVÁ, H.; BRABEC, M.; MALÝ, M., **In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor**, *Toxicology in Vitro*, **2007**, 21, 1268-1275.

BLEASEL, M.D.; ALDOUS, S., **In vitro evaluation of sun protection factors os sunscreen agents using a novel UV spectrophotometric technique**, *International Journal of Cosmetic Science*, **2008**, 30, 259-270.

BRENNER, M.; HEARING, V.J., **The protective role of melanin against UV damage in human skin**, *Photochemistry and Photobiology*, **2008**, 84 (3), 539-549.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L., **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão**, *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **2003**, 13, 129-146.

CALAFAT, A.M.; WONG, L.Y.; YE, X.; REIDY, J.A.; NEEDHAM, L.L., **Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: national health and nutrition examination survey 2003-2004**, *Environmental Health Perspectives*, **2008**, 116 (7), 893-897.

CASWELL, M., **Sunscreen formulation and testing**, *Cosmetics and Toiletries*, **2001**, 116 (9), 49-60.

CHENG, J.; LI, Y.S.; ROBERTS, R.L.; WALKER, G., **Analysis of 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate in sunscreen products by HPLC and Raman spectroscopy**, *Talanta*, **1997**, 44, 1807-1813.

CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTI, M.C.; SALVADOR, A., **Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography use of cyclodextrins as mobile phase modifier**, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 921, 207-215.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PASCUAL-MARTI, M.C., **Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by flow injection-isodifferential derivate ultraviolet spectrometry**, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 428, 183-190.

COHEN, C.; DOSSOU, K.G.; ROUGIER, A., **Episkin: an in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties**, *Toxicology in Vitro*, **1994**, 8 (4), 669-671.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S., **Fundamentos de Cromatografia**, UNICAMP, Campinas-SP, 2006.

DE ORSI, D.; GIANNINI, G.; GAGLIARDI, L.; PORRÀ, R.; BERRI, S.; BOLASCO, A.; CARPANI, I.; TONELLI, D., **Simple extraction and HPLC determination of UV-A and UV-B filters in sunscreen products**, *Chromatographia*, **2006**, 64, 509-515.

DENCAUSSE, L.; GALLAND, A.; CLAMOU, J.L.; BASSO, J., **Validation of HPLC method for quantitative determination of Tinosorb S and three other sunscreens in a high protection cosmetic product**, *International Journal of Cosmetic Science*, **2008**, 30, 373-382.

DIFFEY, B.L., **Ultraviolet radiation and human health**, *Clinics in Dermatology*, **1998**, 16, 83-89.

DIFFEY, B.L.; FARR, P., **Sunscreen protection against UVB, UVA and blue light: an in vivo and in vitro comparison**, *British Journal of Dermatology*, **1991**, 124, 258-263.

DUTHIE, M.S.; KIMBER, I.; NORVAL, M., **The effects of ultraviolet radiation on the human immune system**, *British Journal of Dermatology*, **1998**, 140, 995-1009.

EL-BOURY, S.; COUTEAU, C.; BOULANDE, L.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M., **Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method**, *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 340, 1-5.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O., **Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial**, *Química Nova*, **1999**, 22 (5), 724-731.

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

Food and Drug Administration, Department of Health & Human Services, **Sunscreen drug products for over-the-counter human use: final monograph**, Federal Register, **1999**, 64 (98), 27666-27693.

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

GRANGER, K.L.; BROWN, P.R., **The chemistry and HPLC analysis of chemical sunscreen filters in sunscreens and cosmetics**, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2001**, 24 (19), 2895-2924.

GRUIJL, F.R., **Health effects from solar UV radiation**, *Clinics in Dermatology*, **1998**, 16, 83-89.

HUHEEY, J.E.; KEITER E. A. KEITER, R.L., **Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity**, 4<sup>a</sup> Ed., **1993**.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, **2003**.

KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; GONZÁLEZ, M.L.L.P.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M., **Validation of a HPLC method for simultaneous determination of five sunscreens in lotion preparation**, *International Journal of Cosmetic Science*, **2006**, 28, 219-224.

KIMBROUGH, D.R., **The photochemistry of sunscreens**, *Journal of Chemical Education*, **1997**, 74, 1.

KIRIDENA, W.; POOLE, C.F.; ATAPATTU, S.N.; QIAN, J.; KOZIOL, W.W., **Comparison of the separation characteristics of the organic-inorganic hybrid octadecyl**

**stationary phases XTerra MS C18 and XBridge C18 andShield RP18 in RPLC**, *Chromatographia*, **2007**, 66, 453-460.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.C.; PITTELKOW, M.R., **Photoprotection**, *Lancet*, **2007**, 370, 528-537.

LONNI, A.A.S.G.; DUARTE, J.C.; OLIVEIRA, F.M.; MELQUIADES, F.L.; FERREIRA, D.D.D.; APPOLONI, C.R., **Fluorescência de raios X por dispersão de energia aplicada no controle de qualidade de protetor solar**, *Latin American Journal of Pharmacy*, **2008**, 27 (5), 661-667.

LOWE, N.J.; SHAATH, N.A.; PATHAK, M.A., **Sunscreens: Development, evaluation and regulatory aspects**, Marcel Dekker, **1997**, New York.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A., **Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria**, *Anais Brasileiro de Dermatologia*, **1986**, 61 (4), 121-124.

MATSUMURA, Y.; ANATHASWAMY, H.N., **Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin**, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2004**, 195, 298-308.

MELQUIADES, F.L.; FERREIRA, D.D.; APPOLONI, C.R.; LONNI, A.A.S.G.; MINARDI, F., **Análise de bloqueadores solares através da metodologia EDXRF**, Publicação Técnica, Universidade Estadual de Londrina, **2008a**.

MELQUIADES, F.L.; FERREIRA, D.D.; APPOLONI, C.R.; LOPES, F.; LONNI, A.G.; OLIVEIRA, F.M.; DUARTE, J.C., **Titanium dioxide determination in sunscreen by energy dispersive X-ray fluorescence methodology**, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 613, 135-143.

MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S., **Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores**, *Caderno de Farmácia*, **2002**, 18, 81-87.

NASH, J.F.; TANNER, P.R., **Sunscreen**, *Cosmetic Science and Technology*, **2006**, 30, 131-151.

NOLE, G.; JOHNSON, A.W., **An analysis of cumulative lifetime solar ultraviolet radiation exposure and the benefits of daily sun protection**, *Dermatologic Therapy*, **2004**, 17, 57-62.

OLADEPO, S.A.; LOPPNOW, G.R., **Ultraviolet resonance Raman spectroscopy as a robust spectroscopic tool for in situ sunscreen analysis**, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 628, 57-66.

OSTERWALDER, U.; HERZOG, B., **Sun protection factors: world wide confusion**, *British Journal of Dermatology*, **2009**, 161, 13-24.

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

RASTOGI, S.C.; JENSEN, G.H., **Identification of UV filters in sunscreen products by high-performance liquid chromatography-diode-array detection**, *Journal of Chromatography A*, **1998**, 828, 311-316.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F., **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**, *Química Nova*, **2004**, 27 (5), 771-780.

RIBEIRO, R.P., **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais**, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2004**.

RUVOLO JUNIOR, E.C., **Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (in vivo)**, FDA, COLIPA, SAA, *Cosmetics On Line*, **1997**, 19 (105), 37-46.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A., **Sunscreen analysis A critical survey on UV filters determination**, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 537, 1-14.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A.; JAIME, M.A., **Near-critical carbon dioxide extraction and liquid chromatography determination of UV filters in solid cosmetic samples: A green analytical procedure**, *Journal of Separation Science*, **2005**, 28, 2319-2324.

SCALIA, S., **Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 870, 199-205.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D.; CHRISTOFFEL, J.; RIMOLDI, G.; JARRY, H.; WUTTKE, W., **Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones**, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2006**, 214, 1-7.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A., **Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products**, *Inorganica Chimica Acta*, **2007**, 360, 794-802.

SHAATH, N.A., **The chemistry of sunscreens**, *Cosmetics and Toiletries*, **1986**, 101, 55-70.

SHIH, Y.; CHENG, F.C., **Determination of sunscreen agents in cosmetic products using microwave-assisted extraction and liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 876, 243-246.

SILVA, C.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C., **Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência**, *Química Nova*, **2004**, 27 (2), 270-276.

SIMEONI, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; SCALIA, S., **Assay of common sunscreen agents in suncare products by high-performance liquid chromatography on a cyanopropyl-bonded silica column**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 38, 250-255.

Site: [www.revistavivasaude.uol.com.br](http://www.revistavivasaude.uol.com.br), acessado em 22/06/2010.

SMYRNIOTAKIS, C.G.; ARCHONTAKI, H.A., **Development and validation of a non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in suncare formulations**, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1031, 319-324.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J., **Introduction to modern liquid chromatography**, John Wiley & Sons, **1979**, New York.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J., **Ultraviolet light induced alteration to the skin**, *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký*, **2006**, 150 (1), 25-38.

TANNER, P.R., **Sunscreen product formulation**, *Dermatologic Clinics*, **2006**, 24, 53-62.

TOMASELLA, F.P.; ZUTTING, P.; LOVE, L.J.C., **Determination of sun-screen agents in cosmetic products by micellar liquid chromatography**, *Journal of Chromatography*, **1991**, 587, 325-328.

URBACH, F., **Ultraviolet radiation and skin cancer of humans**, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1997**, 40, 3-7.

VANQUERP, V.; RODRIGUEZ, C.; COIFFARD, C.; COIFFARD, L.J.M.; ROECK-HOLTZHAUER, **High-performance liquid chromatography method for the**

**comparison of the photostability of five sunscreen agents**, *Journal of Chromatography A*, **1999**, 832, 273-277.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J.R.; MÜLLER-GOYMANN, C.C., **Artificial sun protection: sunscreens and their carrier systems**, *Current Drug Delivery*, **2006**, 3, 405-415.

WANG, L.H., **Voltametric behavior of Sunscreen Agents at Mercury Film Electrode**, *Electroanalysis*, **2002**, 14, 773-781.

WANG, S.P.; CHENG, W.J., **Determination of p-aminobenzoates and cinnamate in cosmetic matrix by supercritical fluid extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography**, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 416, 157-167.

WANG, S.P.; LEE, W.T., **Determination of benzophenones in a cosmetic matrix by supercritical fluid extraction and capillary electrophoresis**, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 987, 269-275.

WOLF, R.; WOLF, D.; MORGANTI, P.; RUOCCO, V., **Sunscreen**, *Clinics in Dermatology*, **2001**, 19, 452-459.

YOUNG, A.R., **Chromophores in human skin**, *Physics in Medicine and Biology*, **1996**, 42, 789-802.