UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

FILTROS SOLARES: DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA E
CROMATOGRÁFICA

ELIZÂNGELA ABREU DUTRA

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a Titular Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2000

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

Dutra, Elizângela Abreu
D978f   Filtros solares : determinação espectrofotométrica e
cromatográfica / Elizângela Abreu Dutra. -- São Paulo,
2000.
150p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Farmácia.

Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Filtro solar : Cosmetologia   2. Cosméticos :
Controle de qualidade   I. T. II. Kedor-Hackmann,
Erika Rosa Maria, orientador.

668.55   CDD

ELIZÂNGELA ABREU DUTRA

**FILTROS SOLARES: DETERMINAÇÃO
ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

**Professora Titular Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Presidente e Orientadora**

Prof^a Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

Prof^a Dr^a Vera Lúcia Borges Isaac Rangel

São Paulo, 29 de novembro de 2000

*"Lembra-te do teu Criador nos dias da tua mocidade,
antes que venham os maus dias, e cheguem os anos dos quais
venhas a dizer: Não tenho neles contentamento."
Ec. 12:1*

*Agradeço ao meu Deus, que de uma
forma tão maravilhosa me capacitou,
dando-me força, coragem e determinação
para que eu comesse essa jornada e não
esmorecesse, provando-me a cada dia a sua
fidelidade e o seu amor.*

À minha querida mãe que, com seu grande amor, soube, apesar da distância aliviar as minhas ansiedades nos momentos difíceis dessa experiência.

*Aos meus irmãos, Elisson, Enejane
e Gabriel, ao meu pai, ao meu padrasto
Pedro Lopes e aos meus cunhados Henri
e Ellen que de uma forma tão especial me
deram força e incentivo.*

*À Professora Dr^a Erika Rosa
Maria Kedor-Hackmann, pela amizade,
e por aceitar orientar-me, depositando sua
confiança no meu potencial de trabalho.*

À Coordenadoria do curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido durante todo desenvolvimento da pesquisa (Proc.98/05069-7)

À Professora Dr^a ***Maria Inês Rocha Miritello Santoro*** pela amizade, atenção e valiosas sugestões para realização deste trabalho.

À Professora Dr^a ***Maria Valéria R. V. de Paola*** pelas formulações cedidas.

Aos Professores Dr. ***Jorge Luiz S. Martins*** e Dr. ***João Fernandes Magalhães*** pela atenção e solidariedade.

À ***Francisca*** e ***Luciano Moriconi*** pelo imensurável apoio, atenção e carinho que me dedicaram em todo tempo.

À ***Umberto Ivan Moriconi (Ivanzinho)*** pela preciosa amizade, incentivo, apoio e carinho dedicado.

À ***Iria e Vicente Nolla*** pela amizade e incentivo.

Às minhas companheiras de apartamento ***Flávia, Suzana*** e ***Adriana Paiva*** pela amizade conquistada e companhia nas madrugadas para realização final deste trabalho.

Aos colegas e amigos: ***Anil, Martin , Fátima, Andréia, Maria Aurora, Ixis, Celina, Nájlá, Adriana, Moacir e Mônica***, pelo companheirismo em todo tempo, pela colaboração e sobretudo pela amizade.

Às funcionárias: *Regina M. Rojas, Elizabete C. Paiva, Celi, Elaine M. Ychico, Benedita E. S. Oliveira, Jorge* e *Luzanira* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela atenção durante a realização deste trabalho.

Aos Bibliotecários *Ângelo, Adriana de Almeida, Leila* e *Maria Luiza* pela atenção durante o levantamento bibliográfico e correção das referências bibliográficas.

À empresa ISP Van Dyk pelas amostras cedidas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, nas mais diferentes circunstâncias, colaboraram com eficiência e amizade para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
RESUMO
ABSTRACT

	Página
I- INTRODUÇÃO.....	02
II- REVISÃO DA LITERATURA.....)	06
2.1- O sol.....	06
2.2- Radiações Ultravioleta (UV).....	07
2.3- Pele X Radiações Solares.....	10
2.4- Câncer de pele.....	13
2.5- Filtros solares.....	15
2.6- Fator de Proteção Solar (FPS).....	22
2.7- Espectrofotometria no ultravioleta / visível.....	24
2.8- Cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
2.9- Métodos de análises de filtros solares.....	29
III- OBJETIVOS.....	36
IV- MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1- Materiais.....	38
4.1.1- Solventes e Reagentes.....	38
4.1.2- Filtros químicos empregados como padrão.....	38
4.1.3- Matérias-primas utilizadas para formulação da emulsão.....	39
4.1.4- Equipamentos e Vidraria.....	39
4.2- Métodos analíticos.....	41
4.2.1- Ensaio preliminares.....	41
4.2.1.1- Identificação dos filtros solares.....	41
4.2.1.2- Espectro de absorção no UV da mistura dos filtros solares químicos em estudo.....	43
4.2.1.3- Preparação das formulações.....	43
4.2.1.3.1- Formulações base.....	43
4.2.1.3.2- Formulações comerciais.....	44
4.3- Validação da metodologia analítica.....	46
4.3.1- Padronização do método espectrofotométrico.....	46
4.3.1.1- Construção da curva de Ringbom.....	47
4.3.1.2- Construção da curva de calibração para o método espectrofotométrico.....	49
4.3.1.3- Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para o método espectrofotométrico.....	52
4.3.1.4- Aplicação do método espectrofotométrico nas amostras simuladas e comerciais.....	55

4.3.1.4.1- Determinação do teor de cada filtro nas amostras comerciais e simuladas.....	55
4.3.1.5- Teste de recuperação.....	57
4.3.2- Padronização do método cromatográfico.....	59
4.3.2.1- Construção da curva de calibração para o método cromatográfico.....	60
4.3.2.2- Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para o método cromatográfico.....	61
4.3.2.3- Determinação do limite de detecção e de quantificação.....	62
4.3.2.4- Aplicação do método cromatográfico nas amostras simuladas e comerciais.....	64
4.3.2.4.1- Determinação do teor de cada filtro nas amostras simuladas e comerciais.....	64
4.3.2.5- Teste de recuperação.....	65
4.3.3- Determinação do fator de proteção solar (FPS).....	68
V- RESULTADOS.....	71
5.1- Identificação dos filtros solares.....	71
5.1.1- Determinação da solubilidade.....	71
5.1.2- Ponto de fusão.....	71
5.1.3- Espectro de absorção no ultravioleta.....	71
5.1.4- Espectro de absorção no UV da mistura dos filtros solares químicos em estudo.....	72
5.2- Validação da metodologia analítica.....	75
5.2.1- Padronização do método espectrofotométrico.....	75
5.2.1.1- Construção da curva de Ringbom.....	75
5.2.1.2- Construção da curva de calibração.....	80
5.2.1.3- Pesquisa de interferentes a partir de excipientes.....	86
5.2.1.4- Aplicação do método padronizado a amostras simuladas e comerciais.....	88
5.2.1.5- Teste de recuperação.....	92
5.2.2- Padronização do método cromatográfico.....	93
5.2.2.1- Construção da curva de calibração.....	95
5.2.2.2- Pesquisa de interferentes a partir de excipientes.....	99
5.2.2.3- Determinação do limite de detecção e quantificação.....	100
5.2.2.4- Aplicação do método padronizado a amostras simuladas e comerciais.....	103
5.2.2.5- Teste de recuperação.....	109
5.2.3- Determinação do fator de proteção solar	112
VI- DISCUSSÃO.....	117
VII- CONCLUSÕES.....	133
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

RESUMO

RESUMO

Para minimizar os efeitos danosos a pele causados pelas radiações ultravioleta (UV), novos produtos cosméticos contendo filtros solares tem sido desenvolvidos e estão disponíveis no comércio. Consequentemente é necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa desses filtros solares em produtos cosméticos.

O objetivo desta pesquisa foi a determinação quantitativa e simultânea dos filtros solares químicos, tais como, benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila contidos em preparações cosméticas, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria no UV/visível. Paralelamente foi determinado o FPS para as amostras utilizando a espectrofotometria no uv/visível.

A separação e determinação quantitativa pelo método cromatográfico foi realizada usando uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm), fase móvel constituída de metanol-água (85:15, v/v), com vazão de 1,0mL/min e detecção no UV a 310nm. Os coeficientes de correlação e percentuais de recuperação para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila foram de 0,9999 e 98,9%; 0,9995 e 99,9%; 0,9998 e 98,9%, respectivamente. A média do desvio padrão relativo foi de 0,6%.

A determinação espectrofotométrica só foi possível quando os filtros em estudo estão de forma isolada nas preparações cosméticas. O método espectrofotométrico foi validado a 287nm, 310nm e 306nm para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, respectivamente; os coeficientes de correlação foram de 0,9998; 0,9999; 0,9998, respectivamente. O percentual de recuperação para a amostra comercial contendo apenas metoxicinamato de octila foi de 99,6%. A média do desvio padrão relativo foi de 0,5%.

O Fator de Proteção Solar (FPS) determinado pelo método espectrofotométrico, para as preparações comerciais, não correspondeu aos mesmos valores rotulados.

ABSTRACT

ABSTRACT

In order to minimize the damaging effects to the skin caused by the ultraviolet (UV) radiation, several cosmetic products containing sunscreens has been developed and are available commercially. Consequently, it is necessary to develop and validate an analytical method for quantitative determination of sunscreen agents in cosmetic products.

The aim of this research was to develop a high performance liquid chromatographic and a UV / visible spectrophotometric quantitative method for simultaneous determination of chemical sunscreens benzophenone-3, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate contained in cosmetic products. At the same time, the Sun Protection Factor (SPF) was determined for the samples using UV / visible spectrophotometry.

The separation and quantitative determination was achieved using a LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) column, a mobile phase constituted of methanol-water (85:15, v/v), a flow-rate of 1.0 mL/min and UV detection at 310nm. The correlation coefficient and percentage of recovery for benzophenone-3, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate were 0.9999 and 99.05%; 0.9995 and 100.55%; 0.9998 and 98.05%, respectively. The average relative standard deviation (RSD) was 0.6%.

The spectrophotometric determination was possible only when the sunscreens studied were in an isolated form, in cosmetic preparations. The spectrophotometric method was validated at 287nm, 310nm and 306nm for benzophenone-3, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate, respectively. The correlation coefficients were 0.9998, 0.9999 and 0.9998, respectively. The percentage of recovery for commercial sample containing only octyl methoxycinnamate was 99.6%. The average relative standard deviation (RSD) was 0.5%.

The Sun Protection Factor (SPF) determined by the spectrophotometric method, in the commercial preparations, did not corresponded to the labeled values.

INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

A pele é considerada o retrato da saúde e do bem-estar físico e mental de um indivíduo, influencia diretamente na estética e no psíquico das pessoas, conseqüentemente em suas atividades sociais e profissionais ^{6, 105}. O cuidado do bem-estar da pele deixou de ser preocupação apenas de esteticistas e dermatologistas. Cientistas de todo o mundo aprofundam estudos no sentido de selecionar substâncias capazes de impedir os efeitos danosos causados na pele pelas radiações solares ^{75, 94}.

As radiações particularmente nocivas emitidas pelo sol são: Ultravioleta A (UVA) compreendendo radiações entre 320 e 400nm, Ultravioleta B (UVB) com radiações entre 290 e 320nm e Ultravioleta C (UVC) com radiações entre 100 e 290nm. As radiações UVC ainda não ultrapassam a camada de ozônio, situada a aproximadamente 25 mil metros de altitude, porém nos últimos anos essa camada protetora vem sofrendo modificações pela agressão dos poluentes, concentrados especialmente nas grandes cidades. Como conseqüência, determinados locais da terra já apresentam a camada de ozônio mais fina, como por exemplo na Austrália, permitindo a passagem de raios mais agressivos e em maior quantidade ^{43,101,114}.

As radiações solares são um dos principais fatores que geram radicais livres na pele, os quais podem engatilhar uma série de reações dermatológicas indesejáveis com seqüelas irreversíveis, como diminuição

das células de Langerhans, responsáveis pela resistência imunológica da pele; degeneração da elastina em uma massa amorfa (elastose), destruição das fibras de colágeno na derme e, até, desenvolvimento de câncer de pele^{11, 73, 82, 86}. A radiação solar é o fator mais importante e responsável por 90% dos casos de câncer de pele em todo o mundo, segundo “Skin Câncer Foundation”¹⁶. Foi comprovado um aumento de 7% do câncer de pele nas últimas décadas³⁷.

Atualmente, para prevenir ou minimizar os efeitos danosos induzidos pelas radiações solares, o mecanismo de fotoproteção mais utilizado e com ampla divulgação nos últimos tempos é a aplicação tópica de Protetores Solares, encontrados no mercado sob as mais variadas marcas e com diferentes Fatores de Proteção Solar (FPS)⁷³. A proteção solar é definida pela capacidade de um produto bloqueador absorver, refletir e espalhar 95% das radiações incidentes sobre a pele⁶⁷.

O uso regular de filtros solares evita o desenvolvimento de ceratoses solares, precursores do carcinoma de células escamosas na pele. Por isso não se deve expor-se ao sol sem a proteção de um produto com filtro solar eficiente⁷³. Com isso, aumenta a responsabilidade do laboratório de controle de qualidade, uma vez que os protetores solares pertencem à categoria de produtos cosmecêuticos, ou seja, cosméticos que além da ação cosmética possuem uma ação terapêutica por incluírem, em sua formulação, substâncias ativas, devendo ser acompanhadas de bulas com especificação exata do seu conteúdo, modo de utilização e possíveis interações com outros medicamentos^{51, 55, 63, 102, 104}.

Por assim ser, merecem atenção todos os produtos que atuam nos cuidados de prevenção e manutenção do bem-estar da pele e seus anexos. Entre estes produtos estão os protetores solares.

A fotoproteção dada pelos filtros solares é geralmente determinada pelos fototestes em voluntários humanos. Porém este processo toma muito tempo, principalmente quando se trata da radiação UVA. Em consequência disso, têm-se desenvolvido técnicas “in vitro” para avaliar a fotoproteção dos filtros solares²⁵.

Nos últimos anos tem ocorrido uma valorização do Fator de Proteção Solar frente à radiação UVA, que tem sido objeto de diversos trabalhos científicos, porém ainda não se conseguiu chegar a um método universalmente aceito para a avaliação do FPS- UVA⁶¹.

Portanto, para a garantia da qualidade dos produtos cosméticos contendo filtro solar, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa destes filtros nas preparações cosméticas, bem como metodologias para definir e medir os FPS na faixa das radiações UVB e principalmente UVA.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

II- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- O SOL

O sol, fonte de luz, calor e energia, proporciona uma sensação de bem-estar e felicidade que tanto necessitamos nos dias menos alegres. Dele depende a vida na terra e nisto reside seu principal benefício, porém pode ser extremamente prejudicial quando se expõe a ele de forma desprevenida e incontrolada^{65, 75, 114}.

A exposição excessiva ao sol, principalmente durante os períodos de verão, pode causar efeitos agudos e crônicos sobre a pele. Dentre os efeitos agudos pode-se citar perda de água, aspecto opaco, perda da elasticidade, eritema, queimadura solar de diferentes graus e descamação, bronzeado, manchas e herpes simples; e dentre os efeitos crônicos pode-se citar o envelhecimento precoce, elastose actínica e câncer de pele^{5, 34, 59, 74, 103}.

A penetração da radiação solar na pele não é regular, depende de diferenças individuais, de raça e também da distância do sol à terra (latitude e altitude), da capacidade refletora do meio onde o indivíduo se encontra, horário do dia, tempo de exposição e condições atmosféricas durante a exposição solar^{17, 36, 79, 82, 111, 116}.

Porém, existem alguns efeitos benéficos causados pelo sol, por exemplo o efeito antiraquitismo produzido pelo aumento da síntese de vitamina D, prevenção do infarto do miocárdio, aumento da resistência contra doenças contagiosas, tratamento da psoríase, vitiligo, dermatite seborréica, estímulo à circulação sanguínea periférica, com conseqüente diminuição da pressão arterial e outras^{8, 22, 65, 101, 116}.

Nas últimas décadas, as pessoas estão passando mais tempo expostas desprevenidamente ao sol, seja por motivos de trabalho ou por simples lazer, procurando obter um bronzeado, que é considerado sinal de beleza, saúde e “status”. Com isso, passam a receber grandes doses de luz UV aumentando assim a incidência de câncer de pele e de fotoenvelhecimento^{59, 68, 83}.

2.2- RADIAÇÕES ULTRAVIOLETA (RUV)

O sol emite radiações eletromagnéticas não ionizantes (REM) compostas de radiação Ultravioleta (100-400nm), Visível (400-780nm), e Infravermelho (780-5000nm). Com relação a saúde humana a forma de REM mais relevante e preocupante é a radiação ultravioleta (RUV)^{36, 52, 95}.

A região ultravioleta possui o mais curto comprimento de onda quando comparado às regiões do visível e infravermelho do espectro solar, e sua energia está inversamente relacionada ao seu comprimento de onda.

As diferenças de nome das radiações estão relacionadas aos comprimentos de ondas dessa energia, os quais determinam a capacidade química de interação principalmente com a pele.

A radiação ultravioleta é composta de radiações de comprimento de onda entre 100 e 400nm, os quais sob o ponto de vista fotobiológico ou para fins didáticos, classificam-se em três zonas fundamentais: UVC (100-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm)^{5, 27, 34, 36, 102, 111, 114}, conforme figura abaixo:

Figura 1: Espectro eletromagnético da luz. (STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. *Cosmet. Toiletries ed. Port*, São Paulo, v.9, n. 3/4, p.30, 1997).

Os raios ultravioleta são suficientemente energéticos para causar reações fotoquímicas, resultando em efeitos que podem afetar a pele de forma aguda ou crônica^{45, 77}.

Região ultravioleta C (100-290nm): esta região é também chamada de região bactericida. É altamente eritematogênica e prejudicial ao tecido vivo por ter maior energia associada ao seu menor comprimento de onda, felizmente, ainda é filtrada pela camada de ozônio, barreira de proteção natural da atmosfera, de tal maneira que a quantidade dessa radiação que atinge a população é muito pequena; porém com a redução dessa camada, ameaça ecológica que paira no ar, as indústrias cosméticas serão obrigadas a se preparar para a chegada dos UVC até a terra^{27, 28, 34, 52, 55, 72, 79, 111}.

Região ultravioleta B (290-320nm): representa apenas cerca de 0,5% do total do espectro solar que chega a terra. Possui alta energia, cerca de 90% são absorvidos na epiderme. São os responsáveis pelos danos agudos e crônicos à pele, tais como manchas, queimaduras (vermelhidão e até bolhas), degeneração das fibras elásticas, envelhecimento precoce e câncer de pele^{28, 67, 79, 103, 114}. Provocam desordem morfológica ou estrutural em nível de epiderme e derme. Os raios UVB também são suspeitos de afetar o sistema imune pela diminuição das células de Langerhans na epiderme, as quais tem um papel muito importante no sistema imunológico da pele^{37, 38}. São mais intensos entre às 10:00 e às 15:00 horas do dia, e são absorvidos pelos vidros^{45, 72, 95, 101, 104}.

Região ultravioleta A (320-400nm): a quantidade de raios UVA que chega a terra é bem maior do que a dos raios UVB. Estão presentes em quantidade semelhantes durante todo o ano, são 1000 vezes menos eritogênicos do que os raios UVB e atravessam a maior parte dos vidros comuns. Porém, penetram mais profundamente na pele indo até a derme, destruindo gradualmente a integridade das fibras de elastina e de colágeno, sendo responsável pelo envelhecimento cutâneo precoce, doenças de fotossensibilidade e câncer de pele^{55, 70, 74, 75, 79, 103-105, 114, 116}. Em excesso, produzem na pele lesão das células de Langerhans e das funções do sistema imunológico, alteram também os melanócitos e o DNA nos pacientes com lupus eritematoso. Promovem o escurecimento da melanina pela fotoxidação da leucomelanina, localizada nas células das camadas externas da epiderme, levando ao bronzeamento^{28, 52, 72, 75}.

Quando uma radiação solar atinge a pele uma parte é refletida e outra parte penetra e é absorvida. As radiações de menor comprimento de onda (λ), mais energéticas, são intensamente absorvidas pela epiderme, enquanto que as radiações de maior comprimento de onda, menos energéticas, penetram mais profundamente^{5, 82}.

Em consequência de todos esses fatores nocivos causados pelas radiações ultravioleta, a exposição ao sol sem a proteção de um produto com filtro solar eficiente para prevenir ou minimizar esses efeitos pode causar danos irreversíveis à pele dos indivíduos.

2.3- PELE x RADIAÇÕES SOLARES

A pele é o único órgão que limita o corpo com o meio ambiente, protegendo o organismo contra a perda de água por evaporação e contra o atrito. É o único órgão que apresenta dois tipos de envelhecimento, o cronológico ou intrínseco, comum a todos os outros órgãos, relacionado com a idade, e cujos mecanismos ainda não estão bem definidos, e o envelhecimento causado pelo sol, chamado de fotoenvelhecimento¹⁰³.

A pele é considerada um dos órgãos mais complexos sendo o maior do corpo humano, compreendendo 5% do seu peso total, com superfície de aproximadamente 2m² em um indivíduo adulto. É responsável por uma infinidade de funções, dentre elas, a defesa contra elementos físicos, químicos e imunológicos; possui uma grande capacidade renovadora e de reparação^{5, 79, 104, 114}. Ela é composta de várias camadas – a epiderme (células vivas); a derme (cólageno e elastina que proporcionam suporte e elasticidade) e a hipoderme (gordura subcutânea)^{17, 66, 69}, conforme Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da pele. (ZORETTO, N.L. *Atlas de anatomia humana*, São Paulo: IBEP, 1987. p.169.)

A epiderme é quem nos protege mais diretamente contra as radiações solares. Nela existem cromóforos, como o DNA e os constituintes das membranas das células, que são capazes de absorver as radiações solares e que podem ser danificados com exposição solar prolongada^{58, 82, 84}.

A epiderme é formada por 5 (cinco) camadas celulares que, da periferia para o centro, são as seguintes: estrato córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e germinativo⁷⁹. A epiderme possui 4 (quatro) tipos de células diferenciadas estrutural e funcionalmente: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Todas elas possuem extrema importância no processo de proteção natural e defesa do organismo, relacionados à proteção solar^{69, 79}.

A derme é constituída por fibras de colágeno, elastina e reticulina. Promove a flexibilidade da pele, mantém a homeostase, e é responsável pela produção de melanina. A hipoderme é considerada um isolante

térmico, cuja atividade é basicamente amortizar traumas físicos ou mecânicos^{114, 116}.

Quando a pele é exposta às radiações solares de forma excessiva sempre ocorrem alterações biológicas e fisiológicas. O dano causado à pele pelas radiações ultravioleta pode ser revertido parcial ou totalmente pelo sistema intrínseco às células da epiderme ou às células da camada mais profunda. Os danos que não forem revertidos irão se acumulando nessas células que então, num determinado momento, irão se reproduzindo com pequenos defeitos específicos. Por isso muitas alterações causadas pela luz do sol só começam ser visíveis por volta dos 40 anos, quando então são nítidas as queratoses, manchas, rugas e até lesões malignas^{45, 101, 104}.

A melanina, o ácido urocânico e o espessamento do estrato córneo, são fatores responsáveis pela proteção natural da pele contra as radiações eritematógenas^{114, 116}.

A melanina tem uma importante função protetora, apesar de ser considerada um filtro solar clássico muito pobre. O bronzeamento, as queimaduras solares e a perda de umidade, ocorrem quando a melanina que migrou até o estrato córneo e a superfície da pele, sofre oxidação pela radiação UVA^{52, 116}. A quantidade de melanina presente vai variar dependendo da raça e da parte do corpo⁸². Está presente tanto no estrato córneo como na epiderme e normalmente não se encontra na derme¹⁹.

O ácido urocânico é um produto de degradação metabólica da histidina, aminoácido encontrado na pele humana. Sob a incidência das radiações UV ele passa de sua forma trans à forma cis, absorvendo energia no comprimento de onda de 280nm. Sua retirada da pele durante o banho de mar ou piscina ou, ainda, pela evaporação, explica o aumento de sensibilidade da pele e da queimadura solar, após a exposição solar¹¹⁶.

O espessamento do estrato córneo ocorre em função das radiações solares, que promovem um aumento da velocidade mitótica das células epidérmicas no transcorrer de 4 a 7 dias. Assim, a epiderme torna-se mais grossa e impermeável às radiações eritematógenas^{5, 116}.

2.4- CÂNCER DE PELE

A radiação solar é o principal fator de risco para o câncer de pele, embora nem todos os mecanismos biológicos estejam totalmente esclarecidos para todos os tipos de tumores⁷³. Para que se produza o câncer de pele é necessário incidência de quantidade de luz entre 280-320nm acumulada durante anos, seja do sol ou de fontes luminosas artificiais¹⁷.

A incidência de câncer de pele tem aumentado na maior parte do mundo nos últimos anos. Sua ocorrência é mais freqüente que todos os outros cânceres combinados^{43, 83, 101}. Estima-se que a cada ano, aproximadamente 1 milhão de pessoas são diagnosticadas com câncer de pele e que cerca de 10.000 morrem de melanoma maligno⁸⁷.

O câncer de pele pode ser definido como o crescimento anormal de células que resulta num tumor, o qual pode apresentar-se em forma de caroço, vermelhão, feridas, manchas e outros¹⁰¹.

Os tipos de câncer mais produzidos pela radiação ultravioleta são os basocelulares, os espinocelulares e o melanoma^{74, 101}. Estes tumores tem uma evolução lenta, geralmente demoram meses ou anos para se tornarem aparentes, porém o melanoma, tumor de células pigmentadas, é potencialmente fatal^{17, 68, 114}.

O melanoma inicia-se a partir de poucas células pigmentadas (melanócitos) que se multiplicam de maneira desorganizada. Inicialmente, observa-se uma fina mancha, que engrossa e cresce atingindo tecidos mais profundos⁵⁷.

A exposição excessiva à radiação UVB pode causar câncer de pele como também uma supressão do sistema imunológico. Quando as substâncias químicas celulares absorvem energia, formam-se partículas altamente reativas, por exemplo radicais livres, as quais liberam energia para voltar ao seu estado menos energético. O DNA pode ser considerado a molécula-alvo da pele, porém o mecanismo correto de como os raios UV causam câncer ainda não está esclarecido⁸³.

Acredita-se que por volta dos 20 anos de idade 70% dos danos já foram causados à pele, que mais tarde, após os 40 anos, provocarão manchas, rugas e tumor de pele. Por isso, deve-se usar filtro solar desde a infância até a velhice¹⁰¹. Deve-se incentivar a proteção às crianças, pois elas recebem uma grande dose de raios ultravioleta durante a sua vida antes dos 18 anos. Recomenda-se evitar o sol do meio dia, programando as atividades para antes das 10:00hs da manhã ou à tarde após as 16:00hs reduzindo a exposição para 75%⁶⁶.

Bebês até seis meses não devem fazer uso de filtros solares, e acima de seis meses e crianças não devem usar filtros solares químicos em alta concentração, sendo mais indicada a opção de filtros físicos^{14, 87}.

Nos Estados Unidos, constatou-se que o uso regular de um protetor solar com FPS superior a 15, desde os 6 anos até aos 18 anos, pode reduzir em aproximadamente 78% o risco de desenvolver o câncer de pele ao longo da vida⁸.

Devido a todos os fatores nocivos causados pelo sol, é necessário uma prevenção contra as radiações UV, com aparatos físicos, por exemplo uso de chapéus, camiseta e guarda-sol, e o uso diário de um protetor solar adequado.

2.5- FILTROS SOLARES

O filtro solar é uma substância química de uso tópico que tem a capacidade de refletir ou absorver as radiações ultravioleta que atingem a pele, minimizando assim os efeitos danosos dessas radiações sobre a mesma¹⁰².

O primeiro filtro solar documentado apareceu em 1928, nos Estados Unidos, com a introdução comercial de uma emulsão contendo dois filtros químicos, salicilato de benzila e cinamato de benzila. Mas só na década de 80 o filtro solar tornou-se ingrediente fundamental nos produtos para se obter uma pele saudável^{1, 55, 93, 94}.

De acordo com o tipo de proteção que oferecem, os filtros solares podem ser classificados em :

Filtros Físicos: tem a função de refletir ou espelhar as radiações ultravioleta A e B que incidem sobre a pele, evitando que ocorra uma agressão específica às células da pele, funcionando como barreira. Geralmente os filtros físicos são compostos inorgânicos e incluem: dióxido de titânio, óxido de magnésio, óxido de zinco, petrolato vermelho, caulim e outros. Porém o mais utilizado é o dióxido de titânio. São opacos, porém quando suas partículas são diminuídas tornam-se quase transparentes^{6, 52, 80, 95, 96}.

Filtros Químicos: tem a função de absorver as radiações ultravioleta capazes de causar danos à pele humana, transformando-as em calor. Estes são classificados em filtros UVA e UVB, dependendo do tipo de proteção oferecida^{95, 96}. São geralmente compostos aromáticos conjugados com um grupo carbonila. Algumas vezes, um grupo doador de elétron (amina ou metoxi) é substituído na posição orto ou para do anel aromático³⁶. Geralmente são transparentes e incluem: ésteres do ácido p-aminobenzóico, cinamatos e salicilatos eficazes para proteção contra radiações UVB. As benzofenonas, antranilatos e avobenzonas são eficazes para proteção contra radiações UVA^{40, 52, 80}.

Atualmente, filtros físicos e químicos, são incorporados em produtos cosméticos como cremes, loções, batons, xampus, maquilagens e outras preparações para a pele e para os cabelos, a fim de evitar a incidência das radiações que atingem de forma voluntária ou involuntária os seres humanos. A maioria destas formulações contém combinações de filtros solares a fim de se obter um maior efeito protetor^{82, 86}.

A primeira regulação provisória para avaliação de filtros solares nos Estados Unidos foi publicada no Registro Federal em 25 de agosto de 1978 pelo FDA (Food and Drug Administration). Passados mais de 20 anos a indústria cosmética tem adicionado inúmeros produtos contendo filtros solares, no entanto, a validação dos métodos para identificação e quantificação destes produtos é muito pouco encontrada na indústria^{8, 70, 85}.

Nos Estados Unidos, a lista de filtros solares aprovados pelo FDA, também chamada categoria I, inclui 23 filtros solares, sendo que 20 são absorvedores químicos e apenas 3 são filtros físicos³⁶. Dos absorvedores químicos, nove são atualmente usados em produtos protetores disponíveis no mercado e os restantes são raramente ou quase nunca empregados. Dos

nove usados, cinco deles são mais usados em todo o mundo, conforme Quadro 1 ³⁶.

Os filtros que absorvem as radiações UVA e UVB são empregados para formular preparações ou produtos destinados a pessoas que, por características individuais de sua pele (branca) ou por enfermidades (lupus eritematoso), não podem expor-se ao sol sem correr graves riscos na saúde. E os filtros que absorvem apenas radiações UVB são empregados para formular bronzeadores destinados a permitir o escurecimento da pele com fins de beleza sem o aparecimento de queimaduras ¹⁰⁹. Porém, os protetores que absorvem apenas radiações UVB podem estar dando um falso senso de segurança e encorajando as pessoas a ficarem sob o sol por mais tempo e com isso, passam a receber doses desordenadas de radiação UVA ¹¹³.

Quadro 1: Filtros Solares Ultravioleta utilizados nos Estados Unidos.

Filtro Ultravioleta	Comentários
Metoxicinamato de octila	Encontrado em 90% dos protetores solares usados no mundo.
Benzofenona-3 ou Oxibenzona	Encontra-se combinado com o metoxicinamato de octila em muitos produtos.
Salicilato de octila	Usado juntamente com o metoxicinamato de octila e oxibenzona por suas propriedades solventes.
Octocrilena	Encontrado em protetores solares recreativos.
Ácido 2-fenil benzilimidazol-5-sulfônico (PBSA)	Usados em combinação com o metoxicinamato de octila em produtos protetores de uso diário.
Metil antranilato	
Homosalato	
2-dimetilamino benzoato de 2-etil-hexila (Padimato O)	
Avobenzona	Atualmente encontra-se em quatro produtos.
Óxido de zinco	Aprovado recentemente para a categoria I de filtros solares.
Dióxido de titânio	Raramente usado
Ác. p-aminobenzóico	Raramente usado
Aminobenzoato de glicerila	Raramente usado
Amil p-dimetilamino benzoato (Padimato A)	Raramente usado
Etil-4 [di(hidroxipropil)]amino	Raramente usado
Dioxibenzona	Raramente usado
Sulidobenzona	Raramente usado
Cinoxate	Raramente usado
Dietanolamina p-metoxicinamato	Raramente usado
Lavsona + dihidroxiacetona (DHA)	Raramente usado
Petrolato vermelho	Raramente usado
3,4-dimetilfenil glioxilato de sódio	Raramente usado
Salicilato de trietanolamina	Raramente usado

Extraído de: GASPARRO, F.P.; MITCHNICK, M. A Review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem. Photobiol.*, v.68, n.3, p.243-256. 1998;

Características que os filtros solares devem apresentar^{5, 8, 12, 36, 37, 49, 54, 62, 74-76, 83, 95.}

- Capacidade de absorver as radiações nocivas nas região de 290-400nm antes que elas atinjam as células epidérmicas;
- Alta estabilidade fotoquímica;
- Resistência à luz e ao calor;
- Assegurar uma proteção de longa duração sem que seja necessário renovar freqüentemente a aplicação;
- De preferência inodoro;
- Ser estável frente às variações do pH da pele (aproximadamente 5,5);
- Solúvel nos solventes comumente utilizados, como etanol, glicerina e propilenoglicol;
- Insolúvel em água, para assegurar maior permanência na pele frente ao suor e aos banhos de mar e de piscina.
- Ter espalhamento adequado quando aplicado sobre a pele;
- Não manchar a pele e vestimentas;
- Ter inocuidade;
- Ter substantividade, ou seja, capaz de se fixar na camada superficial da epiderme sem penetrar mais profundamente.

- Filtros Solares utilizados como padrão nesta pesquisa

a)- benzofenona-3 (Escalol® 567):

É uma benzofenona substituída usada em formulações protetoras solar como filtro solar por aplicação tópica em concentração de no máximo 6%. Absorve tanto radiação UVA como UVB. É normalmente usada em combinação com outros grupos químicos⁶¹. Também conhecida por 2-

hidroxi-4-metóxi-benzofenona; oxibenzona; Possui a seguinte estrutura química:

PM: 228g

FM: C₁₄H₁₂O₃

É um pó de cor creme; possui leve odor; com densidade específica à 25°C de 1,339 e Ponto de Fusão na faixa de 62-64°C. É solúvel em acetato de etila, álcool etílico e isopropílico, acetona e miristato de isopropila; insolúvel em água, óleo mineral e propilenoglicol. Apresenta pico de absorção máxima no espectro ultravioleta na faixa de 288-289nm em álcool etílico ou óleo mineral com absortividade molar de $\epsilon_{288-329\text{nm}}$: 14.000 mol⁻¹ cm⁻¹. Apresenta boa estabilidade se armazenado em recipiente fechado, em área seca e fria. Deve-se eliminar fontes de calor.

b)- metoxicinamato de octila (Escalol® 557)

É um cinamato substituído usado em formulações protetoras solar como filtro solar por aplicação tópica na concentração de no máximo 10%. Absorve efetivamente a radiação UVB mas absorve pouco ou nenhuma radiação UVA. Sua combinação com a benzofenona pode dar um aumento no efeito fotoprotetor⁶¹. É também conhecido por 2-etil-hexil-p-metoxicinamato de octila; ácido 2-propenóico do éster 3-(4-metoxifenilo)-2-etil-hexila e Parsol MCX. Possui a seguinte estrutura química:

PM: 290g

FM: C₁₈H₂₆O₃

Trata-se de um líquido amarelo claro, praticamente inodoro, com densidade específica à 25°C de 1,008-1,013 e índice de refração a 25°C de 1,542 –1,548. É solúvel em álcool etílico e isopropílico, miristato de isopropila, óleo mineral e óleo de oliva; insolúvel em água, glicerina e propilenoglicol. Apresenta um pico de absorção máxima no espectro ultravioleta na faixa de 289-311nm³ em álcool etílico ou óleo mineral, com absorvidade molar de $\epsilon_{320\text{nm}}$: 23.300mol⁻¹cm⁻¹. Apresenta boa estabilidade se armazenado em recipiente metálico revestido ou de fibra, manter fechado em área fria e sem iluminação.

c)- salicilato de octila (Escalol® 587):

É um salicilato substituído usado em formulações protetoras solar como filtro solar por aplicação tópica na concentração máxima de 5%. Absorve mais radiação UVB ⁶¹. É também conhecido por salicilato de 2-etil-hexila.

Apresenta a seguinte estrutura química:

PM: 250g

FM: C₁₅H₂₂O₃

É um líquido incolor, quase amarelado com odor levemente aromático. Possui densidade específica à 25°C de 1,013-1,022 e índice de refração a 25°C de 1,539 –1,505. É solúvel em álcool etílico e isopropílico, miristato de isopropila, glicerina, propilenoglicol e óleo mineral; insolúvel em água.

Apresenta um pico de absorção máxima no espectro ultravioleta na faixa de 307-310nm em álcool etílico ou óleo mineral, com absorvidade molar de $\epsilon_{306\text{nm}}$: 4.900 mol⁻¹ cm⁻¹. Possui boa estabilidade quando armazenado em local frio e seco, deve-se evitar contato com metais.

2.6- FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

Segundo MEYBECK⁷⁰, a primeira determinação do grau de proteção da luz ultravioleta por uma substância aplicada na pele foi, provavelmente, o trabalho de R. Schulze⁹¹. Neste trabalho o autor define o fator de proteção solar como a relação entre o tempo necessário para causar eritema na pele protegida dividido pelo tempo necessário para causar eritema na pele desprotegida.

O efeito e a efetividade (grau de proteção) de preparações com filtros solares é então caracterizada pelo seu FPS⁵². Este fator é um termo orientativo, representado por um número inteiro, que indica o número de vezes, em unidade de tempo, que o indivíduo poderá se expor ao sol, usando um protetor, sem apresentar o eritema solar (queimadura), tendo como referencial a Dose Eritematógena Mínima (DEM) individual^{8, 67, 69, 105}. O FPS é definido como sendo a energia UV necessária para produzir uma DEM sobre a pele protegida dividida pela energia UV necessária para produzir uma DEM sobre a pele desprotegida⁶¹.

Essa dose pode ser medida em intensidade de luz ou em tempo de exposição. Porém o método mais comum para determinação de FPS *in vivo* é pelo tempo de exposição⁵².

$$FPS = \frac{\text{Tempo de aparecimento da DEM com protetor}}{\text{Tempo de aparecimento da DEM sem protetor}} = \frac{30}{5} = 6$$

Essa relação entre tempo e eritema é observada pelo método *in vivo*, em que se usam 20 indivíduos sadios, durante 3 dias para a conclusão dos resultados¹⁰.

O FPS é determinado, oficialmente, apenas para a radiação UVB, porém, as metodologias para a determinação do grau de proteção UVA estão sendo alvo das atenções nos grandes centros de pesquisas internacionais⁴⁴.

No Brasil não há ainda metodologias oficiais aprovadas para a determinação do FPS. Com a necessidade de se poder controlar a qualidade das preparações farmacêuticas contendo filtros solares de uma forma mais rápida, começou a busca pelos métodos *in vitro*, especificamente, o método espectrofotométrico. Este método utiliza a equação matemática desenvolvida por MANSUR⁶⁰, mostrada a seguir:

$$FPS_{\text{Espectrofotométrico}} = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Onde: $EE(\lambda)$ → Efeito eritematogênico da radiação solar em cada λ ;

$I(\lambda)$ → Intensidade da radiação solar em cada λ ;

$Abs(\lambda)$ → Absorbância em cada λ .

FC → Fator de correção (= 10)

Os valores de $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ são valores já calculados por SAYRE e colaboradores⁸⁸, conforme Quadro 2.

Quadro 2: Ponderação empregada no cálculo do FPS por espectrofotometria (SAYRE e colaboradores⁸⁸).

Comprimento de onda (λ nm)	EE x I (normalizado)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

Embora não seja um método reconhecido oficialmente, vale salientar, que o mesmo é sugerido como método de avaliação da proteção contra UVA^{3, 69}.

Os produtos de proteção solar encontrados no mercado, classificam a sua eficácia protetora de acordo com o seu FPS rotulado. Por isso, é de fundamental importância a padronização do método para quantificação uniforme destes valores.

2.7- ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA (UV) / VISÍVEL

A espectrofotometria no UV / Visível é um dos métodos mais freqüentes aplicados em todo campo onde a informação química quantitativa é exigida. Por exemplo, estima-se que só no campo da saúde, 95% das determinações quantitativas são feitas pela espectrofotometria no UV / visível e estes números representam mais que 3 milhões de testes diários feitos nos Estados Unidos.^{7, 98}

A espectrofotometria baseia-se na medida de transmitância ou absorbância de uma radiação monocromática que atravessa uma solução contendo uma substância absorvente e na relação entre estas medidas e a concentração da espécie absorvente. Essa energia absorvida pela substância em análise provoca a excitação dos elétrons do seu estado fundamental ou normal a estados de maior energia ou estado excitado, fenômeno conhecido como transição eletrônica^{7, 97}.

O tratamento quantitativo da absorção da energia radiante depende da lei geral, conhecida como Lei de Lambert- Beer³⁹.

Quando um feixe de luz monocromática, de intensidade e comprimento de onda determinados, passa através de um recipiente transparente contendo uma solução de uma substância absorvente, uma parte da energia incidente é absorvida no meio e a outra parte é transmitida^{7, 60}.

Se a intensidade da radiação da luz incidente for representada por I_0 , a da luz absorvida por I_a e a da luz transmitida por I_t , então:

$$I_0 = I_a + I_t$$

Em 1760, Lambert investigou a relação entre a intensidade da radiação da luz incidente e a da luz transmitida e observou que a transmitância é independente do valor absoluto da luz incidente. A fração de luz incidente que é absorvida por um meio é proporcional à espessura do meio atravessado e independe da intensidade da luz incidente^{7, 60}.

Em 1852, Beer mostrou que existia uma relação similar entre a absorbância (capacidade de absorver luz) e a concentração de uma solução em análise^{7, 60}.

A lei de Lambert-Beer pode ser então indicada pela expressão:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

ou

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Onde: A é a absorção no comprimento de onda máximo.

ε é a absortividade molar (expressa a intensidade de uma banda de absorção em um espectro no ultravioleta visível, usada quando a concentração é dada em moles/litro)⁹⁷.

a é a absortividade quando a concentração é expressa em outras unidades.

b é a espessura do caminho ótico.

c é a concentração molar da solução em análise.

A lei de Beer tem algumas limitações, uma vez que só se aplica a soluções muito diluídas, geralmente inferiores a 10^{-2} ou 10^{-3} M, pois a distância média entre as espécies responsáveis pela absorção diminui com o aumento da concentração podendo chegar a um ponto que afeta a distribuição de carga das espécies vizinhas. Esta interação faz variar a possibilidade das espécies absorverem a um dado comprimento de onda da radiação. Como o grau de interação depende da concentração, a ocorrência deste fenômeno provoca desvios de linearidade da lei de Beer ³⁹.

A lei de Beer é aditiva, ou seja, pode ser aplicada a uma solução contendo mais do que uma espécie absorvente, desde que não haja interação entre elas ³⁹.

A medida da absorção baseada na radiação ultravioleta e visível encontra muita aplicação para a identificação e determinação de muitas espécies orgânicas e inorgânicas ⁹⁸.

A absorção da luz por uma molécula está associada a uma porção de sua estrutura chamada cromóforo e a elétrons π localizados em sistemas conjugados ^{52, 39}.

Os compostos orgânicos são capazes de absorver radiação eletromagnética porque possuem elétrons de valência que podem ser excitados a altos níveis de energia ^{97, 99}.

A avaliação espectrofotométrica para filtros solares vai depender da concentração do filtro solar, espessura do caminho ótico e intervalo de comprimento de onda ^{56, 116}.

2.8- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

A cromatografia é um processo analítico para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão das afinidades relativas por duas fases: a fase móvel (líquida ou gás) e a fase estacionária ou fixa (sólido ou líquido). Os métodos cromatográficos podem ser empregados para identificação qualitativa e determinação quantitativa de espécies separadas^{21, 98}.

De acordo com a forma física do sistema de cromatografia pode-se definir a técnica geral. A fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico ou disposta sobre uma superfície planar. Baseando-se nesta, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar respectivamente. Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia supercrítica, onde se usa como fase móvel um vapor pressurizado em temperatura acima de sua temperatura crítica, e a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido^{39, 98, 100}.

A cromatografia líquida em coluna divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que se usa colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão^{18, 53}.

A CLAE ocupa um lugar de grande destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa, usada amplamente para separação de compostos hidrocarbonetos aromáticos, como também tem sido descrita em vários trabalhos para análise de filtros ultravioleta^{24, 26, 30, 32, 48, 81, 99, 108, 112}.

A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade⁹⁸.

Esse método envolve sistema onde a fase estacionária, seja uma superfície sólida, líquida, uma resina de troca iônica, ou um polímero poroso, está retida em uma coluna e a fase móvel é forçada através da mesma sob altas pressões.

Os três mecanismos mais usados para realizar a CLAE são: por troca iônica, por partição e por adsorção^{21, 53, 98}.

As mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que estará deixando a coluna cromatográfica é medida por um detector. Os detectores fotométricos UV medem as mudanças na absorção de luz monocromática na região de 190-350nm. Os detectores fotométricos são os mais empregados em CLAE²¹.

A eficácia de uma coluna cromatográfica na separação de dois solutos depende, em parte, da velocidade relativa em que as duas espécies são eluídas. Estas velocidades são, por sua vez, determinadas pelo coeficiente de partição do soluto entre as duas fases⁹⁸.

O tempo de retenção (T_R) é o tempo necessário para que o máximo do pico do soluto alcance o detector de uma coluna cromatográfica⁹⁸.

O fator de capacidade (k') é um parâmetro importante que é amplamente usado para descrever a velocidade de migração do soluto sobre a coluna. O fator de capacidade ideal é aquele que se encontra entre 1 e 5⁹⁸.

A velocidade de migração diferencial é dada pelo fator de seletividade (α).

A análise cromatográfica quantitativa baseia-se ou na altura do pico ou na área do pico. Se as condições cromatográficas forem controladas, os dois parâmetros variam linearmente com a concentração ⁹⁸.

2.9- MÉTODOS DE ANÁLISE DE FILTROS SOLARES

A eficácia de um protetor solar pode ser determinada por métodos físico-químicos *in vitro* e por métodos biológicos *in vivo* ¹⁶.

Os métodos oficiais para avaliação de filtros solares são descritos por órgãos regulamentadores como FDA (Food and Drug Administration), nos Estados Unidos; SAA (Standards Association of Australian), na Austrália; COLIPA (Committee De Liaison Des Associations Europeennes de L' Industries, De Produits Cosmetiques et de Toilette), na Europa ^{63, 67, 90, 106}.

Os métodos *in vivo* são os mais adequados, empregados e oficialmente aceitos por vários países. Porém estes métodos não são suficientemente práticos para serem aplicados em análise de controle de qualidade de protetores solares, de modo a garantir a qualidade de cada lote posto à disposição do consumidor ³⁴.

Os métodos físico-químicos *in vitro* para análise de filtros solares são geralmente de dois tipos: métodos que medem a transmissão da luz UV de um filtro solar colocado sob a forma de um filme em placas de quartzo ou um substrato, ou métodos que medem as características de absorção de uma preparação solar através de uma solução diluída ^{23, 41, 42, 46, 88}.

MEADOWS⁶⁴ avaliou o FPS da combinação dos filtros solares homosalato, benzofena-3 e salicilato de octila com os filtros solares padimato O e metoxicinamato de octila por método *in vitro*.

Muitos pesquisadores vem contribuindo com trabalhos importantes, com a finalidade de obtenção de métodos eficientes baseados em técnicas *in vivo* e *in vitro*^{60, 69}.

Os métodos de análise *in vitro* mais utilizados para identificação e quantificação de filtros solares em preparações cosméticas, são os métodos espectrofotométrico e cromatográfico.

Segundo STOCKADALE¹⁰⁵, os métodos espectrofotométricos utilizados na determinação da eficácia protetora dos filtros solares têm muitas vantagens como facilidade de execução, reprodutibilidade dos resultados, expressam os valores de absorção da radiação UV e são de baixo custo.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido amplamente utilizada na identificação e quantificação dos filtros solares quando estes se encontram associados em preparações cosméticas.

GARCIA e SANTOS³⁴ verificaram o FPS de preparações cosméticas contendo diferentes filtros solares com concentrações e associações variadas, entre eles benzofenona-3 e metoxicinamato de octila, por espectrofotometria na região UV/visível. Foi utilizado como solvente o isopropanol. O cálculo do FPS baseou-se na fórmula matemática de Mansur.

BERGOLD e PONZIO⁹ avaliaram o FPS do metoxicinamato de octila pelo método espectrofotométrico a partir do trabalho de Mansur e colaboradores⁶⁰.

JESPERSEN⁴⁹ avaliou o FPS de algumas formulações cosméticas contendo mistura de benzofenona-3, metoxicinamato de octila, ácido p-aminobenzóico e homosalato por espectrofotometria direta utilizando o dimetilsufóxido (DMSO) como solvente.

AZEVEDO e colaboradores⁴ avaliaram os filtros solares benzofenona-4 (ácido 2-hidróxi-4-metóxi-benzofenona-5-sulfônico) e novantisol (ácido 2-fenil benzimidazol-5-sulfônico) por espectrofotometria derivada, utilizando diferentes solventes como trietanolamina e etanol 95%. O método foi validado apresentando uma boa linearidade, com coeficiente de variação na faixa de 0,55-1,12% e percentual de recuperação variando entre 97,28 e 103,71%.

MICHAUD e colaboradores⁷¹ utilizaram a espectrofotometria derivada para avaliar formulações cosméticas contendo mistura 2-etil-hexil-p-metoxicinamato de octila com ácido sulfônico fenil-benzimidazol, utilizando o propilenoglicol como solvente. Os mesmos filtros também foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna Merck® RP-C₁₈ (10cm), detector UV a 313nm, fase móvel constituída por metanol/água (90:10, v/v), com velocidade de fluxo de 1,0mL/minuto. Os tempos de retenção relativos para 2-etil-hexil-p-metoxicinamato de octila e ácido sulfônico fenil-benzimidazol foram de 5 e 7 minutos, respectivamente.

TAN e colaboradores¹⁰⁸ descreveram um procedimento para avaliação do padimato-O e benzofenona-3 em formulações cosméticas, através da CLAE, utilizando o sulfatiazol como padrão interno. Foram utilizados detector UV a 254nm, fase móvel constituída de

acetonitrila/metanol (10:90, v/v), com velocidade de fluxo de 0,7mL/minuto. Os tempos de retenção relativos para a benzofenona-3, padimato-O e padrão interno foram de 5,7, 7,4 e 3,9 minutos, respectivamente. O método descrito foi validado utilizando formulações base e comerciais. Os coeficientes de variação situaram-se entre 0,6-1,9% e as porcentagens de recuperação variaram de 99,4 a 103,8%.

DAVIS e QUIGLEY²⁴ determinaram filtros solares químicos (salicilato de octila, benzofenona-3, avobenzona, metoxicinamato de octila, 2-etilhexil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato) e físicos (dióxido de titânio, p-aminobenzoato de octil-dimetila) associados e presentes em formulações protetoras comerciais através da cromatografia líquida de alta eficiência. Foram utilizados coluna μ Bondapak C₁₈, detector UV a 254nm, fase móvel constituída por acetonitrila/água (90:10, v/v), com velocidade de fluxo 2,0mL/minuto.

GAGLIARDI e colaboradores^{30, 31}, propuseram dois métodos para determinação de vários filtros solares químicos e físicos, através da CLAE em fase reversa. No primeiro método foram utilizados duas fases móveis, a fase móvel A constituída de acetonitrila/água (15:85, v/v) contendo ácido perclórico 10⁻³ M e perclorato de sódio 10⁻² M, e a fase móvel B constituída de metanol/água (85:15, v/v), ambas com velocidade de fluxo de 2,5mL/minuto. No segundo método foram utilizados detector UV a 311nm, fase móvel constituída de acetonitrila/água (5:95, v/v) contendo ácido perclórico 10⁻³ M e perclorato de sódio 10⁻² M, com velocidade de fluxo de 2,5mL/minuto. Para os dois métodos foi utilizada coluna LiChrosorb® RP-18 10 μ m (Merck).

IKEDA e colaboradores⁴⁸ descreveram um método por CLAE para determinação de vários filtros solares, dentre eles a benzofenona-3 e o metoxicinamato de octila. Foram utilizados coluna TSK gel ODS –80 Tm, detector UV a 325nm, fase móvel constituída de metanol/tetraidrofurano

(THF)/água (4:6:6, v/v), com velocidade de fluxo de 1,0mL/minuto. Os tempos de retenção relativos a benzofenona-3 e metoxicinamato de octila foram de 5 e 17 minutos, respectivamente. O método foi validado e os percentuais de recuperação obtidos variaram de 97,5-102,3% e os coeficientes de variação se situaram dentro do intervalo de 0,2-2,8%.

VANQUERP¹¹² e colaboradores compararam a fotoestabilidade do butil-metoxidibenzoilmetano com a fotoestabilidade da benzofenona-3, n-etóxi-p-aminobenzoato de etila, 3- (4-metil benzilideno)-cânfora, 4-t-butil-4'-metoxi dibenzoilmetano e padimato O por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna Nucleosil 100-5C₈, detector UV a comprimentos de onda variável e fase móvel constituída de metanol/ácido acético (1% em água), com velocidade de fluxo de 1,0mL/minuto.

DINUNZIO e GADDE²⁶ descreveram um método para determinação quantitativa dos filtros solares benzofenona-3, padimato O, metoxicinamato de octila, salicilato de octila e p-aminobenzoato de mentila em associação. Foram utilizados coluna μ Bondapak® C₁₈, detector UV a 313nm, fase móvel constituída de tetraidrofurano/ácido acético/água nas seguintes proporções: (50:0,1:49,9, v/v), (55:0,09:44,91, v/v) e (45:1:54, v/v), e como padrão interno o 2-cloroantraceno, ácido salicílico, ácido antranílico e ácido p-metoxicinâmico, com velocidade de fluxo de 1,0mL/minuto. Os padrões e as amostras foram dissolvidas em tetraidrofurano. O método foi linear quando aplicado a todos os filtros, com coeficiente de correlação entre 0,997 e 1,000. A reprodutibilidade do método foi avaliada e os desvios padrões variaram de 0,8 a 1,1. Os percentuais de recuperação obtidos variaram de 98,4 a 100,7%.

GAGLIARDI e colaboradores³³, propuseram um método por CLAE em fase reversa para determinação quantitativa e qualitativa de filtros solares derivado do ácido p-aminobenzóico (PABA). Foram utilizados coluna

Erbasil® C₁₈, detectores UV a 274 e 295nm, fase móvel constituída de acetonitrila/água (18:82, v/v) contendo perclorato de sódio 10⁻² M e cloreto de tetrametilamônio 10⁻² M, com velocidade de fluxo de 2,0mL/minuto.

POTARD e colaboradores⁷⁸ descreveram um metodologia por CLAE para quantificação dos filtros solares metoxicinamato de octila, benzofenona-3, benzofenona-4, triazona de octila e octocrileno juntamente com a cafeína presentes em várias camadas da pele e em preparações cosméticas.

SCALIA⁸⁹ determinou os filtros solares 2-etil hexil-p-dimetil aminobenzoato, metoxicinamato de octila, benzofenona-3, 4-metilbenzilideno cânfora e 4-t-butil-4'-metoxidibenzoilmetano por CLAE com extração em fluído supercrítico. Foram utilizados coluna Hypersil BDS fenil, detector UV a 320nm, fase móvel constituída de metanol/acetonitrila/tetrahidrofurano/água (45:10:10:35, v/v) contendo 0,5% (v/v) de ácido acético, com velocidade de fluxo de 0,4mL/minuto.

OBJETIVOS

III- OBJETIVOS

- ◆ Separar, identificar e quantificar os filtros solares químicos benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila incorporados em associação nas formulações cosméticas, através do método cromatográfico;
- ◆ Determinar a concentração e a absorbância UV destes filtros solares incorporados isoladamente nas formulações cosméticas, através do método espectrofotométrico na faixa de 190-450nm;
- ◆ Validar as metodologias utilizadas para os métodos cromatográfico e espectrofotométrico;
- ◆ Determinar o FPS para as amostras utilizadas pelo método espectrofotométrico.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

4.1.1- Solventes e Reagentes

- Metanol grau cromatográfico (Merck®);
- Etanol 96% grau de pureza p.a. (Merck®);
- Água MilliQ®;
- Água destilada;

4.1.2- Filtros Químicos empregados como padrão:

- benzofenona-3 (Escalol® 567):
- metoxicinamato de octila (Escalol® 557)
- salicilato de octila (Escalol® 587):

Procedência: ISP- Van Dyk

4.1.3- Matérias-primas utilizadas para formulação da emulsão:

Quadro 3:

Denominação Química	Características	Denominação comercial	Procedência
1- Álcool oleico etoxilado- 10 OE	Emulsionante não iônico O/A EHL= 12,4	Sorbion® O-10	Vital Química
2- Palmitato de isopropila	Emoliente	Polymol® IPP	Vital Química
3- Metil glicose etoxilada 20 OE	Emulsificante O/ A; emoliente	Glucam® E-20	Ionquímica
4- Acetato de cetila	Emoliente plastificante	Acetulam®	Ionquímica
5- Carbomer	Espessante	Carbopol® -940	Galena
6- PEG- 14M	Umectante; lubrificante	Polímero® OX-5	Ionquímica
7- Fenoxietanol e parabenos	Conservante	Phenoben®	Vital Química
8- Óleo mineral poliisobuteno, heptanoato estearílico e poliisobuteno hidrogenado	Microemulsão O/ A (50/ 50) sem tensoativo	Emulzone®	Ionquímica
9- Água destilada	Solvente	Água destilada	
10- benzofenona-3	Filtro Solar	Escalol® - 567	ISP- Van Dyk
11- metoxicinamato de octila	Filtro Solar	Escalol® - 557	ISP- Van Dyk
12- salicilato de octila	Filtro Solar	Escalol® - 587	ISP- Van Dyk

4.1.4- Equipamentos e Vidrarias:

- Espectrofotômetro ultravioleta/visível Beckman – DU série 70, munido de cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora Epson-FX 850;
- Cromatógrafo líquido modelo CG 480 C. com “loop” fixo de 20µL, detector UV, modelo CG 435, Integrador CG modelo 200;
- Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®;
- Aparelho de ultra-som, Thornton, modelo T-14;
- Medidor de pH Digimed, modelo TE- 901;
- Balança eletrônica BG- 2000 Gehaka;

- Balança Analítica- marca Sartorius, capacidade 100g, precisão $\pm 0,0001$;
- Agitador mecânico marca ÉTICA;
- Aparelho MilliQ – Plus, Millipore® para obtenção da água;
- Membrana de filtração de solução Millipore® GVWP 04700, de $0,5\mu\text{m}$;
- Balões volumétricos âmbar, capacidade 100, 50, 25mL;
- Pipetas graduadas e volumétricas, capacidade 10; 5; 4; 3; 2; e 1mL;
- Beckers de 20 e 50mL;
- Espátula de aço inox;
- Microseringa;
- Buretas de 50 e 10mL;
- Unidades filtrantes HV MILLEX® $0,45\mu\text{m}$

4.2- MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 ENSAIOS PRELIMINARES

4.2.1.1- IDENTIFICAÇÃO DOS FILTROS SOLARES

4.2.1.1.1- DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE

Foi realizada segundo a Farmacopéia Americana 24^a ed.¹¹⁰.

4.2.1.1.2- PONTO DE FUSÃO

Seguiu-se o procedimento da Farmacopéia Americana 24^a ed.¹¹⁰.

4.2.1.1.3- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

a)- benzofenona -3

Foram pesados exatamente 50,0mg de benzofenona-3 e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 500,0µg de benzofenona-3/mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 25,0µg de benzofenona-3/mL.

A leitura dessa solução foi feita contra o branco (etanol) na faixa de 190-450nm, com velocidade de varredura de 300nm/min.

b)- metoxicinamato de octila

Foram pesados exatamente 80,0mg de metoxicinamato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 800,0µg de metoxicinamato de octila /mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 40,0µg de metoxicinamato de octila /mL.

A leitura dessa solução foi feita contra o branco (etanol) na faixa de 190-450nm, com velocidade de varredura de 300nm/min.

c)- salicilato de octila

Foram pesados exatamente 60,0mg de salicilato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 600,0µg de salicilato de octila /mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 30,0µg de salicilato de octila /mL.

A leitura desta solução foi feita contra o branco (etanol) na faixa de 190-450nm, com velocidade de varredura de 300nm/min.

4.2.1.2- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DA MISTURA DOS FILTROS SOLARES QUÍMICOS EM ESTUDO

Foi preparada um solução contendo uma mistura dos três filtros: benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila na proporção de 2:3:2 que corresponde a concentração de 6,0, 9,0, e 6,0µg/mL de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, respectivamente.

A leitura dessa solução foi feita contra o branco (etanol) na faixa de 190-450nm, com velocidade de varredura de 300nm/min.

4.2.1.3- PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

4.2.1.3.1- Formulações base⁷⁶

Creme base:

1-Glucam ® E-20	2,5g
2-Carbopol ® 940 (2%)	20,0g
3-Polímero ® OX 5	2,0g
4-Phenoben ®	0,6g
5-Polymol ® IPP	4,0g
6-Acetulam ®	1,0g
7-Sorbion ® O-10	0,8g
8-Emulzone ®	5,0g
9-Água destilada	q.s.p. 100,0g

Amostra 1:

- Creme base _____ 95,0g
- benzofenona-3 _____ 5,0g

Amostra 2:

- Creme base _____ 92,5g
- Metoxicinamato de octila _____ 7,5g

Amostra 3:

- Creme base _____ 95,0g
- salicilato de octila _____ 5,0g

Amostra 4:

- Creme base _____ 82,5g
- salicilato de octila _____ 5,0g
- benzofenona-3 _____ 5,0
- metoxicinamato de octila _____ 7,5g

Amostra placebo:

- Creme base _____ 100g

Os filtros foram adicionados na fase oleosa das emulsões.

4.2.1.3.2- Formulações comerciais

Foram utilizadas formulações comerciais encontradas no mercado contendo os filtros em estudo associados e de forma isolada o metoxicinamato de octila.

Amostra A (FPS= não especificado):

Creme Protetor para as mãos*

Ingredientes ativos: p-metoxicinimato de 2-etilexila

Excipientes: Monoestearato de glicerila; álcool cetílico; álcool benzílico; silicone; óleo mineral; imidazolidinil uréia; lauril sulfato de sódio; perfume; metilparabeno; EDTA dissódico; água desmineralizada.

* Não foi especificado o teor de filtro solar presente.

Amostra B (FPS = 30):

Loção Bloqueadora para o corpo

Ingredientes ativos: benzofenona-3 5%; salicilato de octila 5%;
metoxicinamato de octila 7,5%

Excipientes: Não especificado

Amostra C (FPS = 23):

Loção Bloqueadora facial*

Ingredientes ativos: benzofenona-3; salicilato de octila;
metoxicinamato de octila;

Excipientes: Extrato de Aloe vera; vitamina E; colágeno hidrolizado;
elastina.

* Não foi especificado o teor de filtro solar presente

Amostra D (FPS = 15):

Creme Protetor para cabelos

Ingredientes ativos: metoxicinamato de octila 5,5%; benzofenona-3
2,0%; salicilato de octila 1,0%.

Excipientes: Não especificado

4.3- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

4.3.1.- PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Visando a padronização do método foram fixados os seguintes parâmetros:

- Intervalo de varredura dos espectros de absorção: 190 –450nm
- $\lambda_{\text{máx.}}$ para:
  - benzofenona-3: 287nm
  - metoxicinamato de octila: 310nm
  - salicilato de octila: 306nm
- Velocidade de varredura dos espectros de absorção: 300nm/min
- Solvente: etanol 96% p.a.
- Cubeta de quartzo de 1cm

4.3.1.1- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM

Preparação das soluções padrão

a)- benzofenona-3

Foram pesados exatamente 50,0mg de benzofenona-3 e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 500µg de benzofenona-3/mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 25,0µg de benzofenona-3/mL.

Procedimento

Alíquotas de 1,0 a 20,0mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 1,0 a 20,0µg de benzofenona-3/mL.

b)- metoxicinamato de octila

Foram pesados exatamente 75,0mg de metoxicinamato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 750µg de metoxicinamato de octila /mL.

Uma alíquota de 4,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96%

p.a., obtendo-se uma concentração final de 30,0 μ g de metoxicinamato de octila /mL.

Procedimento

Alíquotas de 1,0 a 20,0mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 1,2 a 24,0 μ g de metoxicinamato de octila /mL

b)- salicilato de octila

Foram pesados exatamente 50,0mg de salicilato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 500 μ g de salicilato de octila/mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 25,0 μ g de salicilato de octila /mL.

Procedimento

Alíquotas de 1 a 20mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 1,0 a 20,0 μ g de salicilato de octila /mL.

4.3.1.2- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Preparação das soluções padrão

a)- benzofenona-3

Foram pesados exatamente 100,0mg de benzofenona-3 e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 1000 μ g de benzofenona-3 /mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 50,0 μ g de benzofenona-3/mL.

Procedimento

Alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0mL da solução padrão (50,0 μ g/mL) foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL e completou-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 μ g de benzofenona-3 /mL em cada balão volumétrico.

As leituras das absorbâncias destas soluções foram efetuadas a 287nm, contra o branco etanol 96% p.a.

b)- metoxicinamato de octila

Foram pesados exatamente 100,0mg de metoxicinamato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 1000 μ g de metoxicinamato de octila /mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 50,0 μ g de metoxicinamato de octila /mL.

Procedimento

Alíquotas de 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5mL da solução padrão (50,0 μ g/mL) foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL e completou-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0 e 13,0 μ g de metoxicinamato de octila /mL em cada balão volumétrico.

As leituras das absorbâncias destas soluções foram efetuadas a 310nm, contra o branco etanol 96% p.a.

c)- salicilato de octila

Foram pesados exatamente 100,0mg de salicilato de octila e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma solução final de 1000 μ g de salicilato de octila /mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 50,0µg de salicilato de octila /mL.

Procedimento

Alíquotas de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0mL da solução padrão (50,0µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL e completou-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0µg de salicilato de octila /mL em cada balão volumétrico.

As leituras das absorbâncias destas soluções foram efetuadas a 306nm, contra o branco etanol 96% p.a.

As curvas de calibração do método espectrofotométrico para os filtros solares em estudo foram construídas plotando-se a concentração versus absorbância de cada solução. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.3.1.3. PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DE EXCIPIENTES PARA O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

As análises foram realizadas com a solução padrão de cada filtro, do creme base e de cada uma das amostras simuladas.

Preparação da solução padrão

a) benzofenona-3

Uma alíquota de 3,0mL de uma solução de 50,0 μ g de benzofenona-3/mL, preparada conforme item 4.3.1.2.a, foi transferida para balão volumétrico de 25mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 6,0 μ g de benzofenona-3 /mL.

b) metoxicinamato de octila

De uma solução de 50,0 μ g de metoxicinamato de octila /mL, preparada conforme item 4.3.1.2.b, uma alíquota de 4,5mL foi transferida para balão de 25mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. A concentração final obtida é de 9,0 μ g de metoxicinamato de octila/mL.

c) salicilato de octila

De uma solução de 50,0 μ g de salicilato de octila/mL, preparada conforme item 4.3.1.2.c, uma alíquota de 3,0mL foi transferida para balão volumétrico de 25mL. A concentração final obtida é de 6,0 μ g de salicilato de octila/mL.

Preparação da solução amostra 1

Foi pesado 1,0g da amostra 1, equivalente a 50,0mg de benzofenona-3, e transferido para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a.

A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 10mL e do filtrado tomou-se uma alíquota de 3,0mL, transferindo-se para um balão volumétrico âmbar de 50mL. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL, obtendo-se uma concentração final de 6,0µg de benzofenona-3 /mL.

Preparação da solução amostra 2

Foi pesado 1,0g da amostra 2, equivalente a 75,0mg de metoxicinamato de octila, e transferido para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a.

A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 10mL e do filtrado tomou-se uma alíquota de 5,0ml, transferindo-se para um balão volumétrico de 50mL. Uma alíquota de 3,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL, obtendo-se uma concentração final de 9,0µg de metoxicinamato de octila /mL.

Preparação da solução amostra 3

Foi pesado 1,0g da amostra 3, equivalente a 50mg de salicilato de octila, e transferido para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a.

A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 10mL e do filtrado tomou-se uma alíquota de 5,0mL, transferindo-se para um balão volumétrico de 50mL. Uma alíquota de 3,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL, obtendo-se uma concentração final de 6,0 μ g de salicilato de octila /mL.

Preparação da solução da amostra placebo

Foi pesado 1,0g de placebo, procedendo-se então conforme preparação da solução amostra.

4.3.1.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NAS AMOSTRAS SIMULADAS E COMERCIAIS

4.3.1.4.1-DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CADA FILTRO NAS AMOSTRAS SIMULADA E COMERCIAL

Preparação das soluções padrão

a) benzofenona-3

Foi utilizado como padrão a média aritmética das leituras de 3 soluções padrão contendo 6,0µg/mL e preparadas como descrito no item 4.3.1.3.a.

b) metoxicinamato de octila

Foi utilizado como padrão a média aritmética das leituras de 3 soluções padrão contendo 9,0µg/mL e preparadas como descrito no item 4.3.1.3.b.

c) salicilato de octila

Foi utilizado como padrão a média aritmética das leituras de 3 soluções padrão contendo 6,0µg/mL e preparadas como descrito no item 4.3.1.3.c.

Preparação da solução amostra simulada 1

A amostra 1 foi preparada de acordo com o descrito no item 4.3.1.3.a. A concentração final é de 6,0µg/mL, tendo sido realizadas 10 determinações para cada amostra. Os resultados foram analisados estatisticamente.

Preparação da solução amostra simulada 2

A amostra 2 foi preparada de acordo com o descrito no item 4.3.1.3.b. A concentração final é de 9,0µg/mL, tendo sido realizadas 10 determinações. Os resultados foram analisados estatisticamente.

Preparação da solução amostra comercial A contendo apenas metoxicinamato de octila

Foi pesado exatamente 1,0g da amostra comercial e transferido para um balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a..

A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 10mL. Uma alíquota de 10,0mL foi transferida para balão volumétrico de 100mL. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25ml. Foi realizada então uma leitura no espectrofotômetro a 310nm e comparado com o padrão. A concentração provável de metoxicinamato de octila presente na amostra calculada a partir de uma solução padrão, foi 9,6µg/L.

Foram efetuadas 10 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

Preparação da solução amostra 3

A amostra 3 foi preparada de acordo com o descrito no item 4.3.1.3.c. A concentração final é de 6,0µg/mL, tendo sido realizadas 10 determinações para cada amostra. Os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.1.5 TESTE DE RECUPERAÇÃO

Os testes de recuperação para o método espectrofotométrico foram realizados apenas para a amostra comercial A.

Preparação da solução padrão

Foram pesados exatamente 75,0mg de metoxicinamato de octila e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico âmbar de 50mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. A concentração final obtida foi de 75,0µg de metoxicinamato de octila /mL.

Preparação da solução amostra comercial A

Foi pesado exatamente 1,0g da amostra e transferido para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a.

A solução foi filtrada, rejeitando-se os dez primeiros mL, uma alíquota de 10,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 100mL. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL.

Foi realizada então uma leitura no espectrofotômetro a 310nm e comparado com o padrão. A concentração provável de metoxicinamato presente na amostra foi calculada, sendo de 9,6µg/L.

Procedimento

Alíquotas das soluções das amostras e dos padrões foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., conforme o esquema a seguir:

Amostras (9,6µg/mL) mL	Solução padrão (75,0µg/mL) ml
—	3,0
10,0	3,0
10,0	2,0
10,0	1,0
10,0	—

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC)².

4.3.2- PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Antes da padronização do método cromatográfico, foram cromatografadas soluções padrão de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, isoladamente, nas concentrações de 8,0, 12,0 e 8,0µg/mL, respectivamente, utilizando-se algumas combinações de metanol/água como fase móvel, identificando assim cada um dos filtros em estudo através de seus tempos de retenção.

Após vários experimentos a fase móvel que proporcionou uma melhor resolução dos picos foi metanol/água (85:15, v/v). Realizou-se então uma leitura de uma solução padrão contendo a mistura dos três filtros numa proporção de 2:3:2, que corresponde a 8,0µg de benzofenona-3, 12,0µg de metoxicinamato de octila e 8,0µg de salicilato de octila/mL.

Visando a padronização do método cromatográfico foram fixados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: metanol / água (85:15, v/v).

A fase móvel foi filtrada em membrana para filtração Millipore® de 0,5µm e degaseificada antes de ser utilizada.

- Vazão: 1,0mL/min.
- Detecção no ultravioleta: 310nm
- Atenuação: 5 a.u.f.s
- Temperatura: ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$)
- Volume de injeção: 20µL
- Coluna: LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®.

Antes de iniciar a leitura no cromatógrafo, cada solução foi filtrada em unidades filtrantes HV MILLEX® 0,45µm

4.3.2.1- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Preparação da solução padrão

Foram pesados exatamente 100,0mg de benzofenona-3, 150,0mg de metoxicinamato de octila e 100,0mg de salicilato de octila e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com a fase móvel metanol/água (85:15), obtendo-se uma solução com concentração final de 50,0µg de benzofenona-3, 75,0µg de metoxicinamato de octila e 50,0µg de salicilato de octila /mL.

Procedimento

Alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0mL da solução padrão (50:75:50µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 25 mL completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0µg de benzofenona-3 e salicilato de octila e de 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0 e 21,0µg de metoxicinamato de octila/mL.

As curvas de calibração do método cromatográfico para cada filtro em estudo foram construídas plotando-se a concentração versus a área do pico obtida. A equação da reta foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.3.2.2-PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DE EXCIPIENTES PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO

As análises foram realizadas com a solução padrão de cada filtro, do creme base e de cada uma das amostras simuladas.

a) Preparação da solução padrão (2:3:2)

Foi tomada por base uma solução contendo 50,0µg de benzofenona-3, 75,0µg de metoxicinamato de octila e 50,0µg de salicilato de octila.

Uma alíquota de 4,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração final de 8,0µg, 12,0µg e 8,0µg para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, respectivamente.

b) Preparação da solução amostra 4

Foi pesado 1,0g da amostra 4, equivalente a 50,0mg de benzofenona-3, 75,0mg de metoxicinamato de octila e 50,0mg de salicilato de octila, transferindo-se para balão volumétrico de 100mL e completando-se o volume com metanol.

A solução foi filtrada, rejeitando-se os primeiros 10mL, do filtrado uma alíquota de 5,0mL foi transferida para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com fase móvel. Desta solução foi transferida uma alíquota de 4,0mL para balão volumétrico de 25mL completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração final de 8,0,12,0 e 8,0 μ g para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, respectivamente.

c) Preparação da solução placebo

Foi pesado 1,0g do placebo, procedendo-se então conforme preparação da solução amostra.

4.3.2.3 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) para o método cromatográfico foram determinados utilizando-se soluções padrão de baixa concentração, considerando a capacidade do método em detectar e quantificar baixas concentrações dos filtros solares presentes nas amostras comerciais.

Procedimento:

Foram preparadas soluções contendo 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 μ g/mL de salicilato de octila; 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 μ g/mL de benzofenona-3 e 3,0, 6,0, 9,0, 12,0 e 15,0 μ g/mL de metoxicinamato de octila.

Foram efetuadas três determinações para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos.

O Cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas fórmulas^{13, 107}.

$$LD = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10$$

4.3.2.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO NAS AMOSTRAS SIMULADAS E COMERCIAIS

4.3.2.4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CADA FILTRO NAS AMOSTRAS SIMULADAS E COMERCIAIS

a) Preparação da solução padrão

Foi utilizado como padrão a média aritmética de 3 determinações das áreas correspondentes a 3 injeções das soluções padrão preparadas conforme item 4.3.2.2.a.

b) Preparação das soluções amostra

Amostra 4 e amostras comerciais A, B, C e D

As soluções de cada amostra foram preparadas conforme descrito no item 4.3.2.2.b

Foram realizadas 10 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

4.3.2.5 TESTE DE RECUPERAÇÃO

a) Preparação da solução padrão

Foram pesados exatamente 100,0mg de benzofenona-3, 150,0mg de metoxicinamato de octila e 100,0mg de salicilato de octila e transferidos para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico âmbar de 100mL, completando-se o volume com a fase móvel metanol/água (85:15), obtendo-se uma concentração final de 50,0 μ g de benzofenona-3, 75,0 μ g de metoxicinamato de octila e 50,0 μ g de salicilato de octila /mL.

b) Preparação das soluções amostra

Amostra comercial A:

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2.2.b, a concentração foi calculada a partir da solução padrão e estima-se que seja de 20,0 μ g de metoxicinamato de octila/mL.

Amostra comercial B:

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2.2.b, obtendo-se uma concentração final de 50,0 μ g de benzofenona-3, 75,0 μ g de metoxicinamato de octila e 50,0 μ g de salicilato de octila /mL.

Amostra comercial C:

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2.2.b, a concentração foi calculada a partir da solução padrão e estima-se que seja de 60,0 μ g de benzofenona-3, 80,0 μ g de metoxicinamato de octila e 55,0 μ g de salicilato de octila/mL.

Amostra comercial D:

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no item 4.3.2.2.b, obtendo-se concentração final de 20,0 μ g de benzofenona-3, 55,0 μ g de metoxicinamato de octila e 10,0 μ g de salicilato de octila/mL.

Alíquotas das soluções das amostras e dos padrões foram transferidas para balões volumétricos de 25ml completando-se o volume com fase móvel, conforme esquemas a seguir:

Esquema 1: Amostra Comercial A

Amostra A (20 μ g/mL) mL	Solução padrão (50:75:50 μ g/mL) mL
5,0	3,0
5,0	3,0
5,0	2,0
5,0	1,0
5,0	—

Esquema 2: Amostra Comercial B

Amostra B (50:75:50 μ g/mL) mL	Solução padrão (50:75:50 μ g/mL) mL
3,0	3,0
3,0	3,0
3,0	2,0
3,0	1,0
3,0	—

Esquema 3: Amostra Comercial C

Amostra C (60:80:55 μ g/mL) mL	Solução padrão (50:75:50 μ g/mL) mL
3,0	3,0
3,0	3,0
3,0	2,0
3,0	1,0
3,0	—

Esquema 4: Amostra comercial D

Amostra D (106:40:20 μ g/mL) mL	Solução padrão (50:75:50 μ g/mL) mL
5,0	3,0
5,0	3,0
5,0	2,0
5,0	1,0
5,0	—

A porcentagem de recuperação (%R) para cada amostra foi calculada de acordo com a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC)².

4.3.3- DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

Para avaliação da eficácia dos protetores solares utilizou-se o método *in vitro* por espectrofotometria, onde os cálculos basearam-se na fórmula matemática de Mansur⁶⁰, que consiste na relação do efeito eritematogênico versus intensidade da radiação em cada λ , conforme tabelado por SAYRE⁸⁶.

Procedimento:

O teste foi realizado para a amostra simulada 4 e amostras comerciais A, B, C e D.

Amostra simulada 4

Foi pesado 1,0g da amostra e transferido para balão volumétrico âmbar de 100mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com etanol 96% p.a. A solução foi filtrada rejeitando-se os 10 primeiros mL.

Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com etanol 96% p.a., obtendo-se uma concentração final de 60,0, 75,0 e 60,0 μ g para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila/mL, respectivamente. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL e completando-se o volume com o mesmo

solvente, obtendo-se concentração final de 12,0, 15,0 e 12,0 μ g de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila/mL, respectivamente.

Amostras comerciais A, B, C, e D

As soluções das amostras comerciais foram preparadas conforme amostras simuladas.

As leituras de cada amostra foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU-70, com varredura de 190-450nm.

As absorbâncias foram registradas entre 290-320nm de 5 em 5nm. A seguir foi aplicada a equação de Mansur para cada ponto de leitura efetuado⁶⁰.

RESULTADOS

V- RESULTADOS

5.1- IDENTIFICAÇÃO DOS FILTROS SOLARES

5.1.1- DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE

Os filtros solares químicos benzofenona-3 e metoxicinamato de octila mostraram-se solúveis em etanol, metanol e insolúveis em água e propilenoglicol. Enquanto que o salicilato de octila foi solúvel em etanol, metanol e propilenoglicol, sendo também insolúvel em água.

5.1.2- PONTO DE FUSÃO

Foi determinado o ponto de fusão apenas para benzofenona-3. O ponto de fusão está na faixa de 62 a 65⁰C.

5.1.3- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam os espectros de absorção no UV da benzofenona-3 (25,0µg/mL), metoxicinamato de octila (40,0µg/mL) e salicilato de octila (30,0µg/mL), respectivamente, em etanol 96% p.a.

5.1.4- ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV DA MISTURA DOS FILTROS SOLARES QUÍMICOS EM ESTUDO

A Figura 6 mostra uma sobreposição dos espectros de absorção dos três filtros solares em estudo.

O traçado S da Figura 6 mostra o espectro de absorção no ultravioleta de uma solução padrão de salicilato de octila numa concentração de $6,0\mu\text{g/mL}$ a 306nm .

O traçado B da Figura 6 mostra o espectro de absorção no ultravioleta de uma solução padrão de benzofenona-3 numa concentração de $6,0\mu\text{g/mL}$ a 287nm .

O traçado M da Figura 6 mostra o espectro de absorção no ultravioleta de uma solução padrão de metoxicinamato de octila numa concentração de $9,0\mu\text{g/mL}$ a 310nm .

A Figura 7 mostra o espectro de absorção de uma solução contendo os três filtros associados numa concentração de 2:3:2, que corresponde as concentrações de $6,0$, $9,0$ e $6,0\mu\text{g}$ de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila/mL, respectivamente.

Figura 3: Espectro de absorção no UV para benzofenona-3 em etanol 96%. Concentração de 25,0µg/L; $\lambda_{\text{máx}}$ 287nm.

Figura 4: Espectro de absorção no UV para metoxicinamato de octila em etanol 96%. Concentração de 40,0µg/L; $\lambda_{\text{máx}}$ 310nm.

Figura 5: Espectro de absorção no UV para salicilato de octila em etanol 96%. Concentração de 30,0µg/L. $\lambda_{\text{máx}}$ 306nm

Figura 6: Sobreposição dos espectros de absorção da benzofenona-3 (B), metoxicinamato de octila (M) e salicilato de octila (S) em etanol 96%. Concentração de 6,0, 9,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 7: Espectro de absorção de uma solução contendo benzofenona-3: metoxicinamato de octila: salicilato de octila (6,0 9,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente)

5.2- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.2.1- PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

5.2.1.1- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM

a)- benzofenona-3

A Figura 8 mostra a curva de Ringbom obtida para benzofenona-3 a 287nm e os valores usados estão descritos na Tabela 1.

b)- metoxicinamato de octila

A Figura 9 mostra a curva de Ringbom obtida para metoxicinamato de octila a 310nm e os valores usados estão descritos na Tabela 2.

c)- salicilato de octila

A Figura 10 mostra a curva de Ringbom obtida para salicilato de octila a 306nm e os valores usados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 1. Valores usados na construção da Curva de Ringbom para benzofenona-3 em etanol 96% p.a. com absorção em 287nm.

Concentração μg/mL	Absorbância 287nm	Transmitância %T	100-T	Logarítmo da Concentração
1,0	0,061	86,90	13,10	0,00
2,0	0,122	75,51	24,49	0,30
3,0	0,188	64,86	35,14	0,48
4,0	0,251	56,10	43,90	0,60
5,0	0,320	47,86	52,14	0,70
6,0	0,386	41,11	58,89	0,78
7,0	0,443	36,06	63,94	0,85
8,0	0,506	31,19	68,81	0,90
9,0	0,581	26,24	73,76	0,95
10,0	0,642	22,80	77,20	1,00
11,0	0,702	19,86	80,14	1,04
12,0	0,764	17,22	82,78	1,08
13,0	0,819	15,17	84,83	1,11
14,0	0,887	12,97	87,03	1,15
15,0	0,906	12,42	87,58	1,18
16,0	1,036	9,20	90,80	1,20
17,0	1,097	8,00	92,00	1,23
18,0	1,146	7,14	92,86	1,26
19,0	1,228	5,92	94,08	1,28
20,0	1,289	5,14	94,86	1,30

Tabela 2. Valores usados na construção da Curva de Ringbom do metoxicinamato de octila em etanol 96% p.a. com absorção em 310nm.

Concentração μg/mL	Absorbância 310nm	Transmitância %T	100-T	Logarítmo da Concentração
1,2	0,106	78,34	21,66	0,08
2,4	0,208	61,94	38,06	0,38
3,6	0,313	48,64	51,36	0,56
4,8	0,418	38,19	61,80	0,68
6,0	0,525	29,85	70,15	0,78
7,2	0,622	23,88	76,12	0,86
8,4	0,730	18,62	81,38	0,92
9,6	0,834	14,66	85,34	0,98
10,8	0,942	11,43	88,57	1,03
12,0	1,035	9,23	90,77	1,08
13,2	1,141	7,23	92,77	1,12
14,4	1,245	5,69	94,31	1,16
15,6	1,347	4,50	95,50	1,19
16,8	1,451	3,54	96,46	1,23
18,0	1,564	2,73	97,27	1,26
19,2	1,658	2,20	97,80,	1,28
20,4	1,763	1,73	98,27	1,31
21,6	1,865	1,36	98,64	1,33
22,8	1,987	1,03	98,97	1,36
24,0	2,085	0,82	99,18	1,38

Tabela 3. Valores utilizados na construção da Curva de Ringbom do salicilato de octila em etanol 96% p.a. com absorção em 306nm.

Concentração µg/mL	Absorbância 306nm	Transmitância %T	100-T	Logarítmo da Concentração
1,0	0,017	96,16	3,83	0,00
2,0	0,034	92,47	7,53	0,30
3,0	0,051	88,92	11,08	0,48
4,0	0,070	85,11	14,89	0,60
5,0	0,087	81,85	18,15	0,70
6,0	0,105	78,52	21,48	0,78
7,0	0,122	75,51	24,49	0,85
8,0	0,142	72,11	27,89	0,90
9,0	0,161	69,02	30,98	0,95
10,0	0,179	66,22	33,78	1,00
11,0	0,192	64,27	35,73	1,04
12,0	0,215	60,95	39,05	1,08
13,0	0,228	59,16	40,84	1,11
14,0	0,252	55,98	44,02	1,15
15,0	0,263	54,58	45,42	1,18
16,0	0,289	51,40	48,60	1,20
17,0	0,305	49,55	50,45	1,23
18,0	0,314	48,53	51,47	1,26
19,0	0,334	46,34	53,66	1,28
20,0	0,347	44,98	55,02	1,30

Figura 8: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico no ultravioleta para a benzofenona-3 em etanol 96%. Concentração das soluções: 1,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Leituras efetuadas a 287nm.

Figura 9: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico para o metoxicinamato de octila em etanol 96%. Concentração das soluções: 1,2 a 24,0 $\mu\text{g/mL}$. Leituras efetuadas a 310nm.

Figura 10: Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico para o salicilato de octila em etanol 96%. Concentração das soluções: 1,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Leituras efetuadas a 306nm.

5.2.1.2- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

a)- benzofenona-3

Os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração são descritos na Tabela 4. A Figura 11 mostra a curva de calibração da benzofenona-3 obtida a 287nm e a Figura 12 mostra uma sobreposição dos espectros na concentração utilizada para obtenção da curva de calibração.

b)- metoxicinamato de octila

Os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração são descritos na Tabela 5. A Figura 13 mostra a curva de calibração do metoxicinamato de octila obtida a 310nm e a Figura 14 mostra uma sobreposição dos espectros na concentração utilizada para obtenção da curva de calibração.

c)- salicilato de octila

Os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração são descritos na Tabela 6. A Figura 15 mostra a curva de calibração do salicilato de octila obtida a 306nm e a Figura 16 mostra uma sobreposição dos espectros na concentração utilizada para obtenção da curva de calibração.

Os valores estatísticos obtidos para as curvas de calibração da benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila estão resumidos nas Tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Tabela 4. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração da benzofenona-3 para o método espectrofotométrico.

Concentração de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância* 287nm
4,00	0,265
6,00	0,388
8,00	0,519
10,00	0,647
12,00	0,772
14,00	0,908

*média de três determinações para cada concentração

Tabela 5. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração do metoxicinamato de octila para o método espectrofotométrico.

Concentração de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância* 310nm
3,00	0,262
5,00	0,434
7,00	0,607
9,00	0,772
11,00	0,953
13,00	1,125

*média de três determinações para cada concentração

Tabela 6. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração do salicilato de octila para o método espectrofotométrico.

Concentração de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância* 306nm
6,00	0,109
8,00	0,147
10,00	0,183
12,00	0,221
14,00	0,256
16,00	0,292

*média de três determinações para cada concentração

Figura 11: Curva de calibração da benzofenona-3 em etanol 96%.
 $\lambda_{\text{máx}}$ 287nm.

Figura 12: Sobreposição dos espectros de absorção da benzofenona-3 (4.0 a 14.0µg/mL em etanol 96%) Velocidade de varredura: 300nm/min

Figura 13: Curva de calibração do metoxicinamato de octila em etanol 96%. $\lambda_{\text{máx}}$ 310nm.

Figura 14: Sobreposição dos espectros de absorção do metoxicinamato de octila (3.0 a 13.0 µg/mL em etanol 96%). Velocidade de varredura: 300nm/min

Figura 15: Curva de calibração do salicilato de octila em etanol 96%.
 $\lambda_{\text{máx}}$ 306nm.

Figura 16: Sobreposição dos espectros de absorção do salicilato de octila (6.0 a 16.0µg/mL em etanol 96%). Velocidade de varredura: 300nm/min.

Tabela 7. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração da benzofenona-3 para o método espectrofotométrico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de a t	Coefficiente de Correlação r
0,0647	0,0007	0,00367	0,63%	0,167	0,9998

Tabela 8. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração do metoxicinamato de octila para o método espectrofotométrico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de a t	Coefficiente de Correlação r
0,0865	0,00017	0,00374	0,54%	0,044	0,9999

Tabela 9. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração do salicilato de octila para o método espectrofotométrico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de a t	Coefficiente de Correlação r
0,0183	-0,0003	0,00132	0,66%	0,165	0,9998

5.2.1.3- PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DE EXCIPIENTES

a)- benzofenona-3

O traçado A da Figura 17 mostra o espectro de absorção referente à solução placebo da amostra simulada 1 de benzofenona-3.

O traçado B da Figura 17 mostra o espectro de absorção referente à solução padrão de benzofenona-3.

O traçado C da Figura 17 mostra o espectro de absorção referente à solução da amostra simulada 1 de benzofenona-3.

b)- metoxicinamato de octila

O traçado A da Figura 18 mostra o espectro de absorção referente à solução placebo da amostra simulada 2.

O traçado B da Figura 18 mostra o espectro de absorção referente à solução padrão de metoxicinamato de octila.

O traçado C da Figura 18 mostra o espectro de absorção referente à solução da amostra simulada 2.

c)- salicilato de octila

O traçado A da Figura 19 mostra o espectro de absorção referente à solução placebo da amostra simulada 3.

O traçado B da Figura 19 mostra o espectro de absorção referente à solução padrão de salicilato de octila.

O traçado C da Figura 19 mostra o espectro de absorção referente à solução da amostra simulada 3.

Figura 17: Sobreposição dos espectros de absorção do placebo (A), padrão (B) e amostra simulada 1 (C) de benzofenona-3 em etanol 96%. $\lambda_{\text{máx}}$ 287nm; Velocidade de varredura: 300nm/min. Concentração: 6,0 μ g/mL.

Figura 18: Sobreposição dos espectros de absorção do placebo (A), padrão (B) e amostra simulada 2 (C) de metoxicinamato de octila em etanol 96%. $\lambda_{\text{máx}}$ 310nm; velocidade varredura: 300nm/min. Concentração: 9,0 μ g/mL.

Figura 19: Sobreposição dos espectros de absorção do placebo (A), padrão (B) e amostra simulada 3 (C) do salicilato de octila em etanol 96%. $\lambda_{\text{máx}}$ 306nm; velocidade de varredura: 300nm/min. Concentração: 6,0 μ g/mL.

5.2.1.4- APLICAÇÃO DO MÉTODO PADRONIZADO A AMOSTRAS SIMULADAS E COMERCIAIS

Os resultados obtidos com aplicação do método espectrofotométrico nas amostras simuladas 1, 2 e 3 estão representados na Tabela 10.

O tratamento estatístico foi efetuado e os resultados estão resumidos na Tabela 11.

Os resultados obtidos com aplicação do método espectrofotométrico na amostra comercial estão apresentados na Tabela 12.

O tratamento estatístico foi efetuado e os resultados estão resumidos na Tabela 13.

A Figura 20 mostra a sobreposição dos espectros de absorção obtidos com o padrão metoxicinamato de octila e a amostra comercial contendo apenas metoxicinamato de octila.

Tabela 10. Resultados obtidos na determinação do teor dos filtros solares presentes nas amostras simuladas 1, 2 e 3 empregando-se o método espectrofotométrico.

Amostra Simulada	Valor teórico μg/g de creme	Valor encontrado* μg /g creme	Teor percentual (%)
1	6,0	5,9	98,3
2	9,0	8,9	98,8
3	6,0	6,1	101,6

* Os dados apresentados foram obtidos através da média de dez determinações.

Amostra 1 → benzofenona-3

Amostra 2 → metoxicinamato de octila

Amostra 3 → salicilato de octila

Tabela 11: Resultados da análise estatística nas amostras simuladas pelo método espectrofotométrico.

Amostra Simulada	Desvio padrão	Coeficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
1	0,5	0,5%	98,3 ± 0,4
2	0,4	0,4%	98,8 ± 0,3
3	0,9	0,8%	101,6 ± 0,3

Tabela 12. Resultados obtidos na determinação do teor do filtro solar (metoxicinamato de octila) presente na amostra comercial A empregando-se o método espectrofotométrico.

Amostra Comercial	Valor teórico* μg/mL	Valor encontrado** μg/mL	Teor percentual (%)
A	9,0	9,7	107,8

*O valor teórico na amostra não foi especificado, considerou-se a concentração de uma solução padrão.

** Os dados apresentados foram obtidos através da média de dez determinações.

Tabela 13: Resultados da análise estatística na amostra comercial A pelo método espectrofotométrico.

Amostra comercial	Desvio padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
A	0,4	0,4%	107,8 ± 0,3

Figura 20: Sobreposição dos espectros de absorção do padrão (P) metoxicinamato de octila ($9,0\mu\text{g/mL}$) e da amostra comercial A (A) contendo metoxicinamato de octila ($9,6\mu\text{g/mL}$) em etanol 96%. Velocidade de varredura: 300nm/min .

5.2.1.5- TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

a)- metoxicinamato de octila

A Tabela 14 apresenta os resultados do teste de recuperação na amostra comercial A.

Tabela 14. Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método espectrofotométrico para amostra comercial A contendo metoxicinamato de octila.

Amostra	Quantidade de padrão adicionada (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado* (µg/mL)	Recuperação (%)
A	9,0	8,85	98,3
A	6,0	6,05	100,8
A	3,0	2,99	99,7

* média de duas determinações.

5.2.2- PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A Figura 21 mostra os cromatogramas obtidos para a identificação dos padrões: benzofenona-3 (B), metoxicinamato de octila (M) e salicilato de octila (C), utilizando fase móvel, metanol/água (85:15, v/v).

Figura 21: Cromatogramas obtidos para os padrões benzofenona-3 (B), metoxicinamato de octila (M) e salicilato de octila (S), nas concentrações de 8,0 μ g, 12,0 μ g e 8,0 μ g/mL, respectivamente.

Condições cromatográficas: Coluna LiChorspher® 100 RP-18 (5 μ m); fase móvel, metanol/água (85:15, v/v); vazão: 1,0mL/min.; detecção: 310nm e temperatura ambiente.

A Figura 22 mostra o cromatograma da separação da mistura dos padrões: benzofenona-3 (B), metoxicinamato de octila (M) e salicilato de octila (C), utilizando fase móvel, metanol/água (85:15, v/v).

Figura 22: Cromatograma obtido da mistura dos padrões benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, numa concentração de 2:3:2, que corresponde a 8,0, 12,0 e 8,0µg/mL, respectivamente. Condições Cromatográficas: Coluna LiChorspher® 100 RP-18 (5µm); fase móvel, metanol/água (85:15, v/v); vazão: 1,0mL/min.; detecção: 310nm e temperatura ambiente.

5.2.2.1- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO CROAMTOGRÁFICO

a)- benzofenona-3

A Figura 23 representa a curva de calibração da benzofenona-3. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 15.

b)- metoxicinamato de octila

A Figura 24 representa a curva de calibração do metoxicinamato de octila. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 16.

c)- salicilato de octila

A Figura 25 representa a curva de calibração do salicilato de octila. Os valores experimentais obtidos para construção da curva de calibração são descritos na Tabela 17.

Tabela 15. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para benzofenona-3.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*
2,0	28578
4,0	55909
6,0	83945
8,0	111854
10,0	139171
12,0	167139
14,0	194010

* média de três determinações para cada concentração

Tabela 16. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para metoxicinamato de octila.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*
3,0	85043
6,0	165813
9,0	244380
12,0	328863
15,0	398801
18,0	481242
21,0	558898

* média de três determinações para cada concentração

Tabela 17. Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico para salicilato de octila.

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	Área*
2,0	9545
4,0	18819
6,0	28092
8,0	37360
10,0	46140
12,0	55790
14,0	65473

* média de três determinações para cada concentração

Figura 23: Curva de calibração da benzofenona-3 em metanol/água (85:15, v/v), 2,0 a 14,0 μg/mL.

Figura 24: Curva de calibração do metoxicinamato de octila em metanol/água (85:15, v/v), 3,0 a 21,0 μg/mL.

Figura 25: Curva de calibração do salicilato de octila em metanol/água (85:15, v/v), 2,0 a 14,0 μg/mL.

Os Valores estatísticos obtidos para as curvas de calibração da benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila estão resumidos nas Tabelas 18, 19 e 20, respectivamente.

Tabela 18. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração da benzofenona-3 para o método cromatográfico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de t	Coefficiente de Correlação r
13916	187	681,68	0,6%	0,325	0,9999

Tabela 19. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração do metoxicinamato de octila para o método cromatográfico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de t	Coefficiente de Correlação r
26769	2063	3033,15	0,94%	0,805	0,9995

Tabela 20. Valores estatísticos obtidos para curva de calibração do salicilato de octila para o método cromatográfico.

Inclinação da reta b	Interseção da reta a	Erro Padrão da Estimativa Se	Erro Padrão da Estimativa relativo Se_R	Significância de t	Coefficiente de Correlação r
4659,5	41	274,72	0,7%	0,177	0,9998

5.2.2.2- PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DE EXCIPIENTES

A Figura 26.a mostra o cromatograma referente à solução da amostra simulada 4.

A Figura 26.c mostra o cromatograma referente à solução padrão da mistura dos filtros em estudo.

A Figura 26.b mostra o cromatograma referente à solução placebo da amostra simulada 4.

Figura 26: Cromatogramas da amostra simulada 4 (a), placebo (b) e padrão (c). Condições cromatográficas: Coluna LiChorspher® 100 RP-18 (5µm); fase móvel, metanol/água v/v (85:15); vazão: 1,0mL/min.; detecção: 310nm e temperatura ambiente.

5.2.2.3- DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

As Tabelas 21, 22 e 23 mostram os dados obtidos para os limites de detecção e quantificação.

Tabela 21. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico para benzofenona-3.

Número	Área (2,0µg/mL)	Área (4,0µg/mL)	Área (6,0µg/mL)	Área (8,0µg/mL)	Área (10,0µg/mL)
1	28578	55631	83887	113292	139611
2	28889	55692	83594	113265	137616
3	28266	55819	83865	113642	138017
4	27760	55512	83860	113865	138415
5	28273	56156	83571	112331	138566
Valor médio	28353	55762	83755	113279	138445
DP	419,4	246,5	158,4	586,1	749,3
Desvio Padrão médio = 431,9; inclinação da curva de calibração = 13968;					
Limite de detecção = 0,09µg/mL; Limite de quantificação = 0,31µg/mL					

Tabela 22. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico para metoxicinamato de octila.

Número	Área (3,0µg/mL)	Área (6,0µg/mL)	Área (9,0µg/mL)	Área (12,0µg/mL)	Área (15,0µg/mL)
1	85043	166969	244380	329430	398801
2	84038	165031	244029	329632	397712
3	84591	165438	244818	329813	397058
4	86047	165931	242731	329222	397084
5	84236	165842	244490	330153	397664
Valor médio	84791	165842	244090	329650	397663
DP	799,4	724,4	810,04	357,6	706,9

Desvio Padrão médio = 679,7; inclinação da curva de calibração = 27004;
Limite de detecção = 0,08µg/mL; Limite de quantificação = 0,25µg/mL

Tabela 23. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico para salicilato de octila.

Número	Área (2,0µg/mL)	Área (4,0µg/mL)	Área (6,0µg/mL)	Área (8,0µg/mL)	Área (10,0µg/mL)
1	9545	18819	27123	37269	46985
2	9802	18567	27167	37665	46958
3	9288	18565	27433	37305	45977
4	10027	18557	27241	37506	45882
5	9566	18904	27670	37399	45584
Valor médio	9646	18682	27327	37429	46277
DP	280,3	166,3	225,5	160,9	650,2

Desvio Padrão médio = 295,9; inclinação da curva de calibração = 4637,4;
Limite de detecção = 0,19µg/mL; Limite de quantificação = 0,64µg/mL

A Figura 27 mostra o cromatograma obtido para os padrões benzofenona-3 (B), metoxicinamato de octila (M) e salicilato de octila (S) no limite de detecção e de quantificação

Figura 27: Cromatograma obtido para os padrões benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila nas concentrações de 2,0, 3,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Condições cromatográficas: Coluna LiChorspher® 100 RP-18 (5 μm); fase móvel, metanol/água v/v (85:15); vazão: 1,0 mL/min.; detecção: 310 nm e temperatura ambiente.

5.2.2.4- APLICAÇÃO DO MÉTODO PADRONIZADO ÀS AMOSTRAS SIMULADAS E COMERCIAIS

Os resultados obtidos com aplicação do método e o tratamento estatístico na amostra simulada 4 estão representados nas Tabelas 24 e 25 e para as amostras comerciais A, B, C e D estão representados nas Tabelas 26 e 27, 28 e 29, 30 e 31, 32 e 33, respectivamente.

Tabela 24. Resultado da análise da amostra simulada 4 contendo benzofenona-3, salicilato de octila e metoxicinamato de octila pelo método cromatográfico.

Amostra 4	Valor Teórico ($\mu\text{g/mL}$)	Valor encontrado* ($\mu\text{g/mL}$)	Teor Percentual %
Benzofenona-3	8,0	7,9	98,8
Metoxicinamato de octila	12,0	11,7	97,5
Salicilato de octila	8,0	8,01	100,1

*Os dados apresentados foram obtidos através da média de 10 determinações.

Tabela 25. Resultados da análise estatística na amostra simulada 4 pelo método cromatográfico.

Amostra	Desvio Padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
Benzofenona-3	0,03	0,4%	98,8 $\pm$ 0,02
Metoxicinamato de octila	0,03	0,3%	97,5 $\pm$ 0,02
Salicilato de octila	0,04	0,5%	100,1 $\pm$ 0,03

Tabela 26. Resultados da análise da amostra comercial A pelo método cromatográfico

Amostra A	Valor Teórico (µg/mL)	Valor encontrado* (µg/mL)	Teor Percentual %
Metoxicinamato de octila	4,0	3,86	96,5

*Os dados apresentados foram obtidos através da média de 10 determinações.

Tabela 27. Resultados da análise estatística na amostra comercial A pelo método cromatográfico.

Amostra A	Desvio Padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
Metoxicinamato de octila	0,02	0,6%	96,5±0,02

Tabela 28. Resultado da análise da amostra comercial B pelo método cromatográfico.

Amostra B	Valor Teórico (µg/mL)	Valor encontrado* (µg/mL)	Teor Percentual %
Benzofenona-3	5,0	5,02	100,4
Metoxicinamato de octila	7,5	7,6	101,8
Salicilato de octila	5,0	5,03	100,6

*Os dados apresentados foram obtidos através da média de 10 determinações.

Tabela 29. Resultados da análise estatística na amostra comercial B pelo método cromatográfico.

Amostra B	Desvio Padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
Benzofenona-3	0,03	0,4%	100,4±0,02
Metoxicinamato de octila	0,08	0,6%	101,8±0,06
Salicilato de octila	0,07	0,8%	100,6±0,05

Tabela 30. Resultado da análise da amostra comercial C pelo método cromatográfico.

Amostra C	Valor Teórico (µg/mL)	Valor encontrado* (µg/mL)	Teor Percentual %
Benzofenona-3	8,0	8,6	107,5
Metoxicinamato de octila	12,0	12,6	105,0
Salicilato de octila	8,0	8,4	105,0

* Os dados apresentados foram obtidos através da média de 10 determinações

Tabela 31. Resultados da análise estatística na amostra comercial C pelo método cromatográfico.

Amostra C	Desvio Padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
Benzofenona-3	0,05	0,5%	107,5±0,04
Metoxicinamato de octila	0,08	0,6%	105±0,06
Salicilato de octila	0,06	0,7%	105±0,04

Tabela 32. Resultado da análise da amostra comercial D pelo método cromatográfico.

Amostra D	Valor Teórico ($\mu\text{g/mL}$)	Valor encontrado* ($\mu\text{g/mL}$)	Teor Percentual %
Benzofenona-3	2,0	3,7	104,0
Metoxicinamato de octila	5,5	8,9	101,6
Salicilato de octila	1,0	1,7	107,5

*Os dados apresentados foram obtidos através da média de 10 determinações

Tabela 33. Resultados da análise estatística na amostra comercial D pelo método cromatográfico.

Amostra D	Desvio Padrão	Coefficiente de variação CV	Intervalo de confiança %
Benzofenona-3	0,03	0,8%	104,0 $\pm$ 0,02
Metoxicinamato de octila	0,04	0,4%	101,6 $\pm$ 0,03
Salicilato de octila	0,04	0,5%	107,5 $\pm$ 0,03

A Figura 28.a mostra o cromatograma referente à solução da amostra comercial B.

A Figura 28.b mostra o cromatograma referente à solução da amostra comercial C.

A Figura 28.c mostra o cromatograma referente à solução da amostra comercial D.

A Figura 28.d mostra o cromatograma referente à solução da amostra comercial A.

A Figura 28.e mostra o cromatograma referente à solução da mistura dos padrões benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila nas concentrações de 8,0; 12,0 e 8,0 μ g/mL, respectivamente.

Figura 28: Cromatogramas das amostras comerciais B (a), C (b), D (c), A (d) e padrão (e). Condições cromatográficas: Coluna LiChorspher® 100 RP-18 (5µm); fase móvel, metanol/água v/v (85:15); vazão: 1,0mL/min.; detecção: 310nm e temperatura ambiente.

5.2.2.5- TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A Tabela 34 apresenta os resultados do testes de recuperação efetuado na amostra comercial A.

A Tabela 35 apresenta os resultados do testes de recuperação efetuado na amostra comercial B.

A Tabela 36 apresenta os resultados do testes de recuperação efetuado na amostra comercial C.

A Tabela 37 apresenta os resultados do testes de recuperação efetuado na amostra comercial D.

Tabela 34. Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a mostra comercial A.

Amostra comercial A	Quantidade de padrão adicionada $\mu\text{g/mL}$	Quantidade de padrão recuperada* $\mu\text{g/mL}$	Recuperação R%
Metoxicinamato de octila	9,0	8,93	99,2
	6,0	5,91	98,5
	3,0	2,84	98,3

*Média de duas determinações.

Tabela 35. Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a mostra comercial B.

Amostra comercial B	Quantidade de padrão adicionada $\mu\text{g/mL}$	Quantidade de padrão recuperada* $\mu\text{g/mL}$	Recuperação R%
Benzofenona-3	6,0	6,11	101,8
	4,0	3,92	98,0
	2,0	1,93	96,5
Metoxicinamato de octila	9,0	9,19	102,1
	6,0	5,94	99,0
	3,0	3,08	102,7
Salicilato de octila	6,0	6,06	101,0
	4,0	3,87	96,8
	2,0	1,91	95,5

* Média de duas determinações.

Tabela 36. Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para amostra comercial C.

Amostra C contendo	Quantidade de padrão adicionada µg/mL	Quantidade de padrão recuperada* µg/mL	Recuperação R%
Benzofenona-3	6,0	5,93	97,5
	4,0	4,07	103,3
	2,0	2,93	97,5
Metoxicinamato de octila	9,0	8,89	98,3
	6,0	5,96	97,8
	3,0	3,09	103,3
Salicilato de octila	6,0	5,92	98,7
	4,0	3,89	97,3
	2,0	1,98	99,0

*Média de duas determinações

Tabela 37. Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a amostra comercial D .

Amostra D contendo	Quantidade de padrão adicionada µg/mL	Quantidade de padrão recuperada* µg/mL	Recuperação R%
Benzofenona-3	2,0	2,02	101,0
	4,0	3,89	97,2
	6,0	5,82	97,0
Metoxicinamato de octila	3,0	2,94	98,0
	6,0	5,85	97,5
	9,0	9,0	100,0
Salicilato de octila	2,0	1,96	98,0
	4,0	4,09	102,2
	6,0	6,07	101,2

** Média de duas leituras.

5.2.3- DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

As Tabelas 38 a 42 resumem os resultados obtidos no teste de avaliação da eficácia protetora.

A Figura 29.a mostra o espectro de absorção obtido para a amostra simulada 2.

A Figura 29.b mostra o espectro de absorção obtido para a amostra comercial A.

A Figura 29.c mostra o espectro de absorção obtido para a amostra comercial B.

A Figura 29.d mostra o espectro de absorção obtido para a amostra comercial C.

A Figura 29.e mostra o espectro de absorção obtido para a amostra comercial D.

Tabela 38. Média das absorvâncias e valores calculados de FPS para a amostra A.

λ nm	Média das absorvâncias*	x EE x l x 10	= FPS calculado
290	0,656	0,0150	0,0984
295	0,624	0,0817	0,5098
300	0,656	0,2874	1,8853
305	0,688	0,3278	2,2553
310	0,717	0,1864	1,3365
315	0,692	0,0839	0,5806
320	0,589	0,0180	0,1060
			7,0

*Média de 3 determinações

Tabela 39. Média das absorvâncias e valores calculados de FPS para a amostra B.

λ nm	Média das absorvâncias*	x EE x l x 10	= FPS calculado
290	1,749	0,0150	0,2624
295	1,789	0,0817	1,4616
300	1,788	0,2874	5,1387
305	1,809	0,3278	5,9299
310	1,840	0,1864	3,4298
315	1,769	0,0839	1,4842
320	1,570	0,0180	0,2826
			18,0

*Média de 3 determinações

Tabela 40. Média das absorvâncias e valores calculados de FPS para a amostra C.

λ nm	Média das absorvâncias*	x EE x l x 10	= FPS calculado
290	1,905	0,0150	0,2858
295	1,936	0,0817	1,5817
300	1,922	0,2874	5,5238
305	1,934	0,3278	6,3397
310	1,963	0,1864	3,6590
315	1,892	0,0839	1,5874
320	1,692	0,0180	0,2167
			19,2

*Média de 3 determinações

Tabela 41. Média das absorbâncias e valores calculados de FPS para a amostra D.

λ nm	Média das absorbâncias*	$\times EE \times I \times 10$	= FPS calculado
290	1,130	0,0150	0,1695
295	1,178	0,0817	0,9624
300	1,199	0,2874	3,4459
305	1,228	0,3278	4,0254
310	1,257	0,1864	2,3430
315	1,205	0,0839	1,0110
320	1,050	0,0180	0,1890
			12,1

*Média de 3 determinações

Tabela 42. Média das absorbâncias e valores calculados de FPS para a amostra simula 4.

λ nm	Média das absorbâncias*	$\times EE \times I \times 10$	= FPS calculado
290	1,742	0,0150	0,2613
295	1,781	0,0817	1,4551
300	1,779	0,2874	5,1128
305	1,799	0,3278	5,8971
310	1,829	0,1864	3,4093
315	1,758	0,0839	1,4750
320	1,561	0,0180	0,2810
			17,9

*Média de 3 determinações

Figura 29: Espectros de absorção no ultravioleta/visível obtidos para as amostras simulada 2 (a) e comerciais A (b), B(c), C (d) e D (e) em etanol 96%. λ máx. 310nm.

DISCUSSÃO

VI- DISCUSSÃO

Devido as alterações ocorridas na camada de ozônio, as radiações ultravioleta tem atingido a terra com maior intensidade e causado vários efeitos danosos a pele humana, onde o mais preocupante deles é o câncer de pele.

Para prevenir ou minimizar estes efeitos, a cada dia surgem novos produtos com filtros solares e fatores de proteção solar (FPS) cada vez mais altos. Porém, o que se observa é que a medida que se aumenta o FPS, aumenta também a quantidade de filtros solares envolvidos na formulação, o que não se justifica, pois a quantidade de radiação UV absorvida é muito pequena para valores acima de 30. Isso só faz aumentar os riscos de fotossensibilidade²⁹. Assim, é indispensável o controle de qualidade para garantia da segurança destes produtos sendo então necessário possuir metodologias para a identificação e quantificação destes filtros solares.

No presente trabalho, foram analisados os filtros solares químicos benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico.

O metoxicinamato de octila é encontrado em 90% dos protetores solares usados no mundo, seja na forma associada com outros filtros solares ou isoladamente. A benzofenona-3 encontra-se combinada com o

metoxicinamato de octila em muitos produtos. E o salicilato de octila, apesar de ser considerado um fraco absorvedor, é encontrado juntamente com o metoxicinamato de octila e benzofenona-3 por suas propriedades solventes³⁶.

No Brasil ainda não existe nenhuma metodologia oficial validada e aprovada para determinação e quantificação de filtros solares presentes em formulações cosméticas. A maioria dos trabalhos voltados para análise qualitativa e quantitativa de filtros solares está relacionada aos métodos cromatográficos e espectrofotométricos, porém poucos trabalhos tratam, especificamente, da determinação da benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila quando estão presentes em associação numa formulação cosmética e nem da validação dos métodos empregados para sua determinação e quantificação^{20, 23, 32, 50, 81, 92, 99, 115}.

1- Ensaio Preliminares

Foram feitos testes preliminares a fim de escolher o solvente, concentração e comprimento de onda adequado para cada filtro solar em estudo.

A escolha do solvente foi em função da solubilidade de cada filtro. Foi escolhido o etanol devido aos três filtros serem solúveis neste solvente, pela transparência do solvente (220nm), não interação com a amostra, baixa toxicidade e também pelo baixo custo.

A escolha do comprimento de onda (λ) adequado é importante para otimização do método. O comprimento de onda escolhido para cada filtro foi aquele onde é máxima a absorção, pois é neste λ onde se caracteriza a absorção máxima.

Assim, o comprimento de onda empregado para a benzofenona-3 foi de 287nm, para metoxicinamato de octila 310nm e para salicilato de octila foi de 306nm, conforme Figuras 3, 4 e 5.

Foi preparada uma solução padrão contendo os três filtros solares em estudo para avaliar se havia alguma interação entre eles. Como pode ser visto nas Figuras 6 e 7 a curva de absorção dos três filtros se sobrepõe na região de 250 a 350nm, não sendo possível visualizar o pico característico da benzofenona-3 (287nm) e nem do salicilato de octila (306nm), mas apenas o pico do metoxicinamato de octila (310nm). Isto pode ser devido ao alto coeficiente de absorvidade do metoxicinamato de octila ($\epsilon_{310\text{nm}} = 23.300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em relação ao salicilato de octila ($\epsilon_{306\text{nm}} = 4.900 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e benzofenona-3 ($\epsilon_{288-329\text{nm}} = 14.000/9400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). E uma vez que o metoxicinamato de octila é comumente usado numa concentração maior que os outros dois filtros então seu pico de absorção sempre irá se sobrepor a eles, não sendo possível a separação dos três filtros pelo método espectrofotométrico simples.

Foram realizados alguns experimentos, na tentativa de se conseguir um deslocamento batocrômico, utilizando-se solução de NaOH 10%, ou um deslocamento hipsocrômico, utilizando-se HCl 0,1N, mas não foi possível a separação dos picos. Porém, o método espectrofotométrico pode ser utilizado para a identificação e quantificação dos filtros solares em estudo quando estes são encontrados isoladamente nas formulações cosméticas.

Não foi encontrada nenhuma formulação cosmética contendo apenas o salicilato de octila, isto pode ser devido a sua baixa absorvidade molar, porém ele é utilizado em associação com outros filtros, principalmente, por suas características como solvente e pela facilidade de formar pontes de hidrogênio com a própria molécula, fazendo com que os elétrons fiquem menos disponíveis para interagir com

outros ingredientes da formulação ou com substratos biológicos encontrados na pele^{12, 36}.

A benzofenona-3 também não foi encontrada isoladamente em formulações cosméticas, enquanto que o metoxicinamato de octila foi encontrado isoladamente em formulações cosméticas e para este foi validado o método espectrofotométrico além do método cromatográfico.

2- Validação da metodologia analítica

A fim de garantir que o método forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos, foram avaliados, neste trabalho, quatro parâmetros da validação para o método espectrofotométrico: linearidade, especificidade, precisão e exatidão e, para o método cromatográfico, além destes, foram avaliados os limites de detecção e quantificação.

Porém, fazer a validação de um método analítico não implica que ele esteja isento de erros e que possa ser usado indiscriminadamente, mas permite obter informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método está adequado para o uso proposto^{13, 15}.

2.1 Padronização do método espectrofotométrico

2.1.1- Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi obtida plotando-se a absorvência versus o logaritmo da concentração. A curva de Ringbom permitiu determinar a faixa de concentração que obedece a lei de Beer, numa zona

aproximadamente retilínea, que foi de 4,0 – 14,0 µg/mL para benzofenona-3 (Figura 8 e Tabela 1), de 3,0 – 13,0 µg/mL para metoxicinamato de octila (Figura 9 e Tabela 2) e de 6,0 – 16,0 µg/mL para salicilato de octila (Figura 10 e Tabela 3).

2.1.2- Curva de calibração - Linearidade

A linearidade de um método analítico pode ser determinada através da análise de regressão linear a fim de determinar se há relação linear entre a resposta instrumental e a concentração conhecida da substância presente nas amostras, ou seja, demonstra a capacidade do método gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma variação conhecida^{13, 35}.

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foi construída uma curva de calibração num intervalo de 4,0 a 14,0 µg/mL para benzofenona-3 (Figura 11 e 12 e Tabela 4), de 3,0 a 13,0 µg/mL para metoxicinamato de octila (Figura 13 e 14 e Tabela 5) e de 6,0 a 16,0 µg/mL para salicilato de octila (Figura 15 e 16 e Tabela 6).

Devido o salicilato de octila ter baixo coeficiente de absortividade molar, foi necessário utilizar concentrações mais altas para obter aproximadamente a mesma faixa de absorção dos outros filtros solares⁵².

Essas concentrações utilizadas para construção da curva de calibração correspondem à leituras, em absorbâncias, entre 0,265 e 0,908 para benzofenona-3, 0,262 e 1,125 para metoxicinamato de octila e 0,109 e 0,292 para salicilato de octila, que são os valores compatíveis com a sensibilidade do equipamento utilizado (Espectrofotômetro Beckman -DU) e com a concentração usualmente encontrada nos protetores solares comercializados no Brasil.

As retas de calibração obtidas para os três filtros solares em estudo foram analisadas pelo Método dos Mínimos Quadrados, observando-se que cada uma das retas passa muito próximo a origem, uma vez que o valor da interseção da reta (a) é insignificante, indicando que o método empregado não está sujeito a erros determinados³⁹.

Obteve-se uma boa linearidade entre a razão das absorbâncias versus concentração com coeficiente de correlação de 0,9998 para benzofenona-3, 0,9999 para metoxicinamato de octila e 0,9998 para salicilato de octila, indicando também que o método segue a lei de Beer em toda a faixa de concentração utilizada.

2.1.3- Pesquisa de interferentes - Especificidade

A especificidade ou seletividade de um método analítico pode ser definida como a habilidade de um método medir exatamente e especificamente a concentração da substância em análise na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra, por exemplo excipientes^{13, 35}.

As Figuras 17, 18 e 19 mostram os resultados da pesquisa de interferência a partir dos excipientes das amostras simuladas de benzofenona-3 (1), metoxicinamato de octila (2) e salicilato de octila (3), respectivamente.

Pode-se observar que o placebo das amostras simuladas não apresenta nenhum componente que possa interferir com o pico máximo dos filtros em análise. Portanto, o método pode ser aplicado à quantificação e identificação destes filtros desde que estejam isoladamente nas formulações.

2.1.4- Aplicação do método padronizado a amostras simuladas e comerciais - Precisão

A precisão de um método analítico está relacionada com o grau de concordância (reprodutibilidade) entre os valores experimentais obtidos: quanto mais próximos entre si estiverem estes valores, maior será a precisão¹³.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila nas amostras simuladas 1, 2 e 3, respectivamente pelo método espectrofotométrico. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor do metoxicinamato de octila na amostra comercial A.

O Coeficiente de Variação (desvio padrão relativo) está relacionado à precisão do método^{47, 98, 107}. Os limites sugeridos na literatura para o coeficiente de variação na determinação de substâncias por métodos analíticos como espectrofotometria e cromatografia, variam. Para alguns autores este deve ser menor que 1% ou não deve exceder 2%^{15, 35, 107, 108}.

O Coeficiente de Variação foi calculado para cada amostra simulada e comercial empregando-se 10 determinações. Pode-se observar que o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) obtido para os três filtros solares presentes nas amostras simuladas foi baixo, indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

A amostra comercial contendo metoxicinamato de octila também foi analisada utilizando o método padronizado e os resultados são

apresentados na Tabela 13, cujo coeficiente de variação também foi baixo.

O espectro de absorção obtido para a amostra comercial é confirmado pela sobreposição com o padrão metoxicinamato de octila, conforme Figura 20.

2.1.5- Teste de recuperação - Exatidão

A exatidão de um método analítico está relacionada com o testes de recuperação, o qual expressa a concordância dos valores experimentais com o valor teórico ou verdadeiro ^{13, 15, 35}.

A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação da amostra comercial A contendo apenas metoxicinamato de octila. Estes resultados estão na faixa de 98,3 – 100,8% apresentando assim pouca dispersão. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método ¹³.

2.2- Padronização do método cromatográfico

Considerando que não foi possível a separação e quantificação dos três filtros solares em estudo pelo método espectrofotométrico, como pode ser visto na Figuras 6 e 7, quando os três filtros em estudo são misturados e avaliados por espectrofotometria há formação de uma única curva de absorção, ficando impossibilitada sua determinação por espectrofotometria.

Pensou-se, então, em aplicar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma vez que poucos são os trabalhos que relatam a separação e determinação da benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila associados em produtos cosméticos, bem como a validação da metodologia empregada.

Foi empregada a CLAE por adsorção em fase reversa, que se baseia na competição entre as moléculas da amostra e as moléculas da fase móvel em ocupar sítios ativos na superfície da fase estacionária apolar, utilizando uma fase móvel polar ^{21, 53, 98}.

Para padronização do método, foi primeiramente verificada a eficiência da coluna cromatográfica RP-18 (LiChrospher® 100 - 5µm, empacotada com octadecilsilano, C-18), de procedência Merck. Segundo SNYDER e colaboradores¹⁰⁰, se a quantificação de componentes for o objetivo do desenvolvimento de um método de CLAE, é recomendável que se obtenha uma resolução na linha de base para todos os picos. Tal resolução ocorre quando o traço do detector para o primeiro pico retorna à linha de base antes que o próximo pico comece a deixar a coluna.

Antes da padronização do método, foram realizadas leituras de cada padrão isoladamente com a finalidade de identificar cada pico obtido, utilizando fase móvel constituída de metanol e água em várias proporções.

Após vários experimentos considerou-se que a fase móvel que apresentava melhor resolução dos picos seria a de metanol/água (85:15, v/v), com velocidade de fluxo de 1,0mL /min e detecção a 310nm como pode se visto na Figura 21.

Optou-se por estes solventes devido apresentarem baixa toxicidade, baixo custo e facilidade de obtenção.

Foram fixados parâmetros de fluxo, comprimento de onda e atenuação para cada filtro solar em estudo, a fim de melhorar os resultados de separação e quantificação.

Em seguida, foi realizada a leitura de uma solução padrão contendo a mistura dos filtros solares em estudo, utilizando-se as condições cromatográficas já estabelecidas, obtendo-se uma boa separação com ótima resolução e integração dos picos.

A fixação das variáveis permitiu uma boa eluição, ficando assim resolvida a separação cromatográfica, conforme Figura 22.

A determinação e quantificação foram efetuadas com base em picos com este tipo de resolução.

2.2.1 Curva de calibração - Linearidade

Com os parâmetros de análise estabelecidos, foram construídas curvas de calibração num intervalo de 2,0 – 14,0 µg/mL para benzofenona-3 (Figura 23 e Tabela 15), de 3,0 – 21,0 µg/mL para metoxicinamato de octila (Figura 24 e Tabela 16) e de 2,0 - 14,0 µg/mL para salicilato de octila (Figura 25 e Tabela 17).

Obteve-se uma boa linearidade entre a razão das áreas versus concentração, com um coeficiente de correlação de 0,9999 para benzofenona-3, 0,9995 para metoxicinamato de octila e de 0,9998 para salicilato de octila conforme Tabelas 18, 19 e 20. Estes coeficientes estão dentro das especificações estabelecidas na literatura ^{35, 39}.

2.2.2. Pesquisa de interferentes – Especificidade

A Figura 26 mostra os resultados da pesquisa de interferentes a partir de excipientes da amostra simulada. Não foi possível a obtenção de placebo para as amostras comerciais devido a não declaração completa de suas formulações.

Pode-se observar que o placebo não apresenta nenhum componente que possa interferir com absorção dos picos de cada filtro presentes na amostra simulada. Comparando os cromatogramas obtidos para as amostras comerciais (Figura 28) com o obtido para a amostra simulada na presença de excipientes (Figura 26.a), pode-se observar que há uma semelhança entre eles, confirmando assim a especificidade do método.

2.2.3- Limite de detecção e de quantificação (LD e LQ)

O limite de detecção de um método analítico corresponde à mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade ^{13, 107}.

O limite de quantificação de um método analítico corresponde à mais baixa concentração da substância em exame presente na amostra que pode ser exatamente e precisamente medida ^{13, 107}.

A fim de verificar se o método seria capaz de quantificar e identificar quantidades maiores que 1,0µg para benzofenona-3 e salicilato de octila e 2,0µg de metoxicinamato de octila presentes nas amostras foi calculado o limite de detecção e quantificação, realizando a leitura de soluções contendo concentrações na faixa da curva de calibração. O desvio padrão médio é então dividido pela inclinação da curva de calibração a fim de se obter uma estimativa do ruído associado ao método.

O limite de detecção aceitável deve ser 3 vezes o valor do sinal-ruído do método e o limite de quantificação deve ser 10 vezes o valor do sinal-ruído do método ^{13, 107, 110}.

As Tabelas 21, 22 e 23 mostram os resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação para benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, para benzofenona-3 de $0,09\mu\text{g/mL}$ e $0,31\mu\text{g/mL}$, para o salicilato de octila foi de $0,19\mu\text{g/mL}$ e $0,64\mu\text{g/mL}$ e para o metoxicinamato de octila foi de $0,08\mu\text{g/mL}$ e $0,25\mu\text{g/mL}$.

Segundo SWARTZ¹⁰⁷ picos maiores aumentam a relação sinal-ruído resultando em LDs e LQs mais baixos, o que pode ser confirmado comparando os resultados obtidos com a Figura 27.

2.2.4- Aplicação do método padronizado às amostras simuladas e comerciais – Precisão

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila na amostra simulada 4. As Tabelas , 26, 28, 30 e 32 apresentam os resultados obtidos na determinação do teor benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila nas amostras comerciais A, B, C e D, respectivamente.

O Coeficiente de Variação foi calculado para as amostras simulada e comercial, empregando-se 10 determinações. Pode-se observar nas Tabela 25, 27, 29, 31 e 33 que os coeficientes de variação (desvio padrão relativo) obtidos para os três filtros solares presentes nas amostras simulada e comercial foram baixos, variando entre 0,4 a 0,8%, indicando uma boa reprodutibilidade do método e uma concordância entre os resultados obtidos.

Os cromatogramas obtidos das amostras comerciais são confirmados pela comparação com o padrão, conforme Figura 28.

2.2.5- Teste de recuperação - Exatidão

As Tabelas 34, 35, 36 e 37 mostram os resultados obtidos para o teste de recuperação das amostras comerciais A, B, C e D, respectivamente. A média dos percentuais de recuperação obtidos é de 98,7% para a amostra A, de 99,3% para a amostra B, de 99,2% para a amostra C e de 99,1% para a amostra D, apresentando assim pouca dispersão. Considera-se que quanto mais a medida se aproxima do valor verdadeiro mais exato é o método ¹³.

Um método pode ser considerado exato quando o intervalo dos resultados obtidos apresenta variação de $\pm 2,0\%$ do valor nominal ³⁵.

2.2.6- Determinação do FPS (Fator de Proteção Solar)

Para saber-se o grau de proteção que cada preparação protetora solar oferece é necessária a determinação do FPS. Este fator é uma referência de grande utilidade na escolha de fotoprotetores. Porém, as metodologias para sua determinação, principalmente com relação às radiações UVA, ainda não estão padronizadas, o que leva a obtenção de resultados variados quando instituições diferentes analisam um mesmo produto.

Segundo STOCKDALE¹⁰⁵ para se obter valores altos de FPS é necessário a utilização de grandes quantidades de filtros solares químicos e físicos associados. Porém KREPS⁵⁴ e AZZELINE³ acreditam que não basta adicionar filtros à formulação, esperando aumentar sua eficácia,

pois estes filtros podem, dependendo de diversos fatores, por exemplo influência dos veículos, aumentar ou diminuir o FPS.

A fim de verificar o FPS solar de formulações protetoras encontradas no comércio, foi utilizado, no presente trabalho, o método espectrofotométrico utilizado por MANSUR e colaboradores⁶⁰, por sua facilidade de execução e baixo custo.

As Tabelas 38 a 42 mostram os resultados obtidos nos testes de avaliação do FPS. Os valores utilizados para o cálculo do efeito eritematogênico (EE) e intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda foram os já calculados por SAYRE e colaboradores⁸⁸, conforme Quadro 2.

Pode-se observar que a amostra simulada 4 (Tabela 42) apresenta FPS muito próximo da amostra comercial B (Tabela 39), o que confirma a concordância das concentrações utilizadas em ambas formulações que foram de 5,0% para benzofenona-3 e salicilato de octila e 7,5% para metoxicinamato de octila.

As amostras comerciais A e C não especificam as concentrações dos filtros solares utilizados em sua formulação.

Os FPS obtidos na análise das amostras não foram os mesmos rotulados pelo fabricante. Para as amostras B, C e D os FPS rotulados são de 30, 23 e 15, respectivamente. A amostra A não traz em seu rótulo o FPS.

GARCIA e colaboradores³⁴ avaliaram o FPS de 13 produtos comerciais pelo método de Mansur, e 62% dos produtos analisados apresentaram valor de FPS acima do rotulado e 38% abaixo do rotulado. Segundo estes autores não existe razão plausível para que a maioria dos

produtos dêem acima ou abaixo do valor rotulado, uma vez que Mansur obteve resultados bem próximos para as determinações *in vitro* e *in vivo* da mesma preparação.

Torna-se necessário então avaliar a influência de fatores que possam aumentar ou diminuir a absorção de cada filtro na formulação, por exemplo a maneira como foi preparada a emulsão e a adição de vários ingredientes ativos e excipientes empregados, pH do sistema, veículos empregados, comportamento reológico da emulsão e outros.

O método espectrofotométrico para determinação do FPS é viável para o controle de fórmulas protetoras solares, pois o mesmo fornece informações preliminares para o desenvolvimento de tais formulações.

CONCLUSÕES

VII- CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho e com os resultados obtidos pode-se concluir:

- ◆ O método espectrofotométrico proposto é preciso, exato, específico e rápido para a determinação e quantificação dos filtros solares em estudo quando estes estiverem presentes isoladamente em formulações cosméticas;
- ◆ Os excipientes presentes nas amostras simuladas não interferiram com o método espectrofotométrico;
- ◆ Os coeficientes de correlação para o método espectrofotométrico mostraram boa linearidade dentro das especificações, variando de 0,9998 a 0,9999.
- ◆ O metoxicinamato de octila presente numa amostra comercial foi identificado e quantificado pelo método espectrofotométrico;

- ♦ A análise feita na amostra comercial contendo metoxicinamato de octila apresentou um coeficiente de variação de 0,4%, um intervalo de confiança de $107,8 \pm 0,3$ e uma recuperação de 99,6%.
- ♦ A benzofenona-3, o salicilato de octila e o metoxicinamato de octila quando estão associados não podem ser separados e identificados por espectrofotometria simples e derivada no ultravioleta.
- ♦ Os padrões benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila foram separados com boa resolução e alta eficiência em curto espaço de tempo (menos de 10 minutos) pela cromatografia líquida de alta eficiência;
- ♦ Os coeficientes de correlação para o método cromatográfico mostraram boa linearidade dentro das especificações, variando de 0,9995 a 0,9999.
- ♦ O método cromatográfico apresentou boa especificidade, precisão, sensibilidade e exatidão quando aplicado às amostras simulada e comercial contendo os filtros solares químicos benzofenona-3, metoxicinamato de octila e salicilato de octila, quando estes são encontrados de forma combinada na formulação cosmética.
- ♦ O FPS determinado pelo método de Mansur não correspondeu aos mesmos rotulados nas amostras comerciais analisadas, talvez por influência dos diferentes excipientes utilizados nas diferentes formulações.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a NBR6023/89, preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos e periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2000.

- 1- AGARELLI, A.B. Proteção solar em produtos multifuncionais. **Rev. Racine**, São Paulo, set/out, p.6,8,10, 1996.
- 2- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15 ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.
- 3- AZZELINI, S.C. Fotoproteção e FPS. **Rev. Racine**, São Paulo, set/out, p.15, 1996.
- 4- AZEVEDO, J.S., VIANA JR, N. V., SOARES, C.D.V. UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry. **II Farmaco**, v.54, n.6, p.573-578, 1999.
- 5- BARATA, E.A.F. Radiação solar e proteção da pele. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa, v.30, p.88-135, 1980.

- 6- BATLLE, C., VILA, O.C. Protectores solares. **Venta OTC**, p.43-46, 1988.
- 7- BECKETT, A. H., STENLAKE, J. B. **Practical pharmaceutical chemistry**. 4.ed. part 2: Chromatography; The basis of spectrophotometry; Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry. Londres: Altholone Press., 1988. p. 85-157; 255-272; 275-325.
- 8- BERNABÉ, M.B.G. La radiacion solar en la mar ese peligroso placer. **Rev. Farm. Pofess.**, jun., p.51-56, 1991.
- 9- BERGOLD, A. M., PONZIO, H. A., RIBEIRO, M.H., CAMARGO, L.N., DIAS, M.C.S., MACIEL, R.A.G., SARORI, .L. Determinação do FPS do Parsol MCX. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.4. jan/fev. p.46-51, 1992.
- 10- BILLHIMER, W.L. Sunscreen efficacy. In: WAGGONER, W.C., eds. **Clinical safety and efficacy testing of cosmetic**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.225-251. [Cosmetic Science and Thecnology Series, v.8].
- 11- BORELI, S. Cosméticos Científicos. **Rev. Super Interessante**, São Paulo, v.11. n.1, p.42-43, 1997.
- 12- BORELI, S.S. Considerações sobre filtros solares. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.6, mar/abr, p.20-22, 1994.
- 13- BRITTAİN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Thecnol. ed. Port.**, Marina del Rey, jun., p.4-28, 1998.
- 14- BRENNER, E., ANDRADE, L., CAVALCANTI, P., DEBELLIAN, F. Filtros solares. **Rev. Racine**, São Paulo, jun., v.53, p.17-22, 1999.

- 15- BRUCE, P., MINKKINEN, P., RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, Austria, v.128, p.93-106, 1998.
- 16- CASTRO, C.A., CARUS, A., PINHEIRO, A., LEONG, K.I., FERRIGNI, N. – Extrato de Cayena (*Hebicus Rosa Sininsis*), um novo componente em formulações anti-solares. Cosmecêutica no Séc XXI. In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos: São Paulo, 1995., v.1, p. 323-335.
- 17- CHARLET, E. Proteccion Cosmética antisolar. In: CHARLET, E. **Cosmética para Farmacêutico**. Zaragoza: Acribia, 1996. p.11-138.
- 18- CHATWAL, G., ANAND, S. **Instrumental methods of chemical analyses**. 6.ed., Himalaya Publishing House. p.585-596.
- 19- CHEDEKEL, M.R. A melanina pode melhorar os filtros solares. **Cosmet. Toiletries ed. Port**, São Paulo, v.10, set/out, p.60-69, 1998.
- 20- CHIAVARI, G., CONCIALINI, V., VITALI, P. High-Performance Liquid Chromatography of some hydroxy-substituted aromatic compounds. **J. Chromatogr.**, v.249, n.2, p.385-392, 1982.
- 21- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1990. p.183-238.
- 22- CRESSONI, B.J.R. Fototerapia: os efeitos benéficos do sol. **Up to Date**, São Paulo, v.2, n.11, p.22. 1996.

- 23- CUMPELIK, B.M. Sunscreens at skin application levels: direct spectrophotometric evaluation. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.31, p.361-366, 1980.
- 24- DAVIS, M.R., QUIGLEY, M.N. Liquid-Chromatographic determination of UV absorbers in sunscreens. **J. Chem. Educ.**, Washington, v.72, n.3, p.279-281, 1995.
- 25- DIFFEY, B. L., ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the UV spectrum. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.40, n.3, p.127-133, 1989.
- 26- DINUNZIO, J.E., GADDE, R.R. Determination of sunscreen compounds in topical sunscreen products. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.519, n.1, p.117-124, 1990.
- 27- ENCICLOPÉDIA de absorvedores de UV para produtos com filtro solar. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.7 jul./ago. p.47-58, 1995.
- 28- EPSTEIN, J.H. Biological effect of sunlight. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., eds. **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.43-54, [Cosmet. Science Technology series].
- 29- FLOYD, D.T., MACPHERSON, B.A., BUNGARD, A., JENNI, K.R.. Formulation of sun protection emulsions with enhanced SPF response. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.112, jun. p.55-64, 1997.
- 30- GAGLIARDI, L., CAVAZZUTI, G., MONTANARELLA, L., TONNELLI, D. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-

- phase high-performance liquid chromatography 2. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.464, n.2, p.428-433, 1989.
- 31- GAGLIARDI, L., AMATO, A., BASILI, A., CAVAZZUTI, G., TONELLI, D. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high- performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.408, nov., p. 409-415. 1987.
- 32- GAGLIARDI, L., AMATO, A., TURCHETTO, L., CAVAZZUTTI, G. HPLC determination of the sunscreen agents Uvinul T-150 in cosmetic products using diode-array detection. **Anal. Lett.**, New York, v.23 n.11, p.2123- 2133. 1990.
- 33- GAGLIARDI, L., AMATO, A., BASILI, A., CAVAZZUTTI, G. Determination of sunscreen agents of the p-aminobenzoic acid type in cosmetic products by reversed- phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.362, p.450-454, 1986.
- 34- GARCIA, S., SANTOS, E.P., LIMA, M.T.L., RAMOS, M.F.S. Avaliação do fator de proteção solar por método in vitro. **Rev. Bras. Farm.**, v.72, n.2, p.39-41, 1991.
- 35- GARFIELD, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington: Association official analytical chemists, 1991. 196p.
- 36- GASPARRO, F.P., MITCHNICK, M. A., NASH, J.F. Review of sunscreen safety and efficacy. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.68, n.3, p.243-256, 1998.

- 37-GERVASI, V.S. Efeitos cutâneos das radiações ultravioleta. **Rev. Cosmiat. Estet.**, jul/ago/set, p.25-30, 1999.
- 38-GILLES, P., MARCK, P. Immunoprotecton in Daily: use cosmetics. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.111, n12, 1996, p.47-65.
- 39-GONÇALVES, M.L.S.S. **Métodos Instrumentais para análise de soluções – análise quantitativa**: espectrofotometria no visível e ultravioleta; erros em química analítica. Lisboa: Fundação Calouste Gulibenkion. 1983, p.13-82, 609-640.
- 40-GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica: farmacologia dermatológica**: Filtros Solares. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, p.1193.
- 41-GORDON, V.C. Evaluation du facteurs de protection solaire. **Parfum. Cosmet. Arom.**, Paris, v.112, p.62-65, 1993.
- 42-GORDON, V.C., KELLY, C.P., ACEVEDO, J. Previsão da fotoirritação e determinação do FPS por método "in vitro". **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.3. mai./jun. p. 36-39, 1991.
- 43-GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar uv radiation. **Eur. J. Cancer**, v.35, n.14, p.2003-2009, 1999.
- 44-HANSEN, J. Filtros solares "Revisão da legislação mundial" **Cosmet. On Line**, v.19, São Paulo, n. 105, p.47-49, 1997.
- 45-HARBER, L.C, LEO, V. A., PRYSTOWSKY, J. H. Intrinsic and extrinsic photoprotection against UVB and UVA radiation. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., eds. **Sunscreens**: development, evaluation and

- regulatory aspects. New York: Marcel Dekker, 1990. p.359-378
[Cosmetic. Science Technology Series, v.10].
- 46-HARRISON, L.B., HEALY, A.V. Sun protection factor (SPF): a range-finding technique. **J. Cosmet.Chem**, v.3, ago., p.259-262, 1982.
- 47-HARTMANN, C. Increasing precision by replicate measurements. **Analisis**, Paris, v.22, n.5, M19-M21, 1994.
- 48-IKEDA, K., SUKEJI, S., YOHYA, W. Determination of sunscreens agents in cosmetic products by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amesterdam, v.482, n.1, p.240-245,. 1989.
- 49-JESPERSEN, N.D. Spectroscopic evaluation os protection factors of sunscreens preparations using dimethysulfoxide as the solvent. **Anal. Lett.**, New York, v.22, n.1, p.293-304, 1989.
- 50-KAIDBEY, K.H.; KLIGMAN,A M. Laboratory methods for appraising the efficacy os sunscreens. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.29, set, p.525-536, 1978.
- 51-KLIGMAN, A.M. Por que Cosmecêuticos? **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, v.6, p.18-20, 1994.
- 52-KIMBROUGH, D. A. The photochemistry of sunscreens. **J. Chem. Educ.**, Washington, v.74, n.1, p.51-53, 1997.
- 53-KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**, Rio de Janeiro: Guanabara, 1984, p.167-169.

- 54-KREPS, S.I. The structure, function and formulation of topical sunscreens
I. Theoretical considerations. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.14,
n.12, p.623-630, 1963.
- 55-LAGE, L. E., BRAUN, L., BORELLI, S. Cosméticos com filtro solar. **Rev. Saúde**, São Paulo, v.172, n.1, p. 54-61, 1998.
- 56-Le Parsol® 1789 enfin autorisé aux états-units. **Parfum. Cosmet. Act.**,
n.135, p.26, 1997.
- 57-LIBERATH, M. Proteção solar, prevenção de câncer de pele. **Rev. Racine**, São Paulo, v.7, n.36, p.54-55, 1997.
- 58-LOESCH, W.T. Responsible sun protection in the media whirlwind. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, p.10, 12, 71, 1998.
- 59- MAES, D., MARENUS K., SMITH, W.P. Novos avanços na fotoproteção. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.4, p.40-45, 1992.
- 60- MANSUR, J.S., BREDE, M.N.R., MANSUR, M. C., AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.61, n.3, p.121-124, 1986.
- 61-MARTINDALE, W. **The Extra Pharmacopoeia** – 30 Rev. ed. I Title II Reynolds, James E.F., London; 1993, p.1233-1235.
- 62-MARTINI, M.C., SEILLER, M. **Actifs et additifs em cosmetologie**: les filtres et écrans solaires. Paris: lec & Doc – Lavoisier, 1992. p. 175-196.

- 63-MCNAMARA, S.H. FDA regulation of cosmeceuticals. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.112, p.41-45, 1997.
- 64-MEADOWS, T. Effect of various sunscreens combination on a product's SPF value. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.41, p.141-146, 1990.
- 65-MENDONÇA, V.L.M., KEDOR, E.R.M. Protetores solares: momentos de conscientização. **Rev. Racine**, São Paulo, v.4, n.24, p.12-14, 1995.
- 66-MENDONÇA, V.L.M. A pele retrata a saúde e o estilo de vida. **J. Diário do Nordeste**, Caderno Viva, Fortaleza, 12 jan. 1997, 1p.
- 67-MENDONÇA, V.L.M., KEDOR, E.R.M. Proteção solar x fator de proteção. **Rev. Racine**, São Paulo, set/out, p.14, 1996.
- 68-MENDONÇA, V.L.M., KEDOR, E.R.M. Avaliação do sinergismo do TiO_2 e filtros químicos em emulsões, através da determinação do fator de proteção solar **In**: Congresso Nacional de Cosmetologia, Encontro Brasileiro de Químicos Cosméticos. 10, São Paulo, 1996. Anais. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, p.162-178.
- 69-MENDONÇA, V.L.M. **Protetores solares de alta proteção: estabilidade física e eficácia**. São Paulo, 1998. 128p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP].
- 70-MEYBECK, A. Objective methods for the evaluation of sunscreens. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.98, p.51-60, 1983.
- 71-MICHAUD, P., SOTO, P., LEROY, T., RODRIGUEZ, F. First-derivative spectroscopic determination of sunscreens in cosmetic

- formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.16, n.3, p.93-104, 1994.
- 72-MOURA, C.J. Radiações e filtros solares. **Rev. Racine**, São Paulo, set/out, p.3-4, 1996.
- 73-MOAN, J. UVA radiation, melanoma induction susncreens, solaría and ozone reduction. **J. Photoch. Photobiol. B: Biol.**, v.24, p.201-203, 1994.
- 74-MULLER, W. Prevention of skin cancer and sun damage. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.2, p.44-46, 85, 1986.
- 75-PAOLA, M.V.R.V., RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.10, set./out., p.40-50, 1998.
- 76-PAOLA, M.V.R.V., RIBEIRO, M.E. **Postila de Formulações Cosmética**, São Paulo, p.48, 1998.
- 77-PELEGER, C., TRULLAS, C. Evaluation de la eficácia imunoprotetora de los filtros solares. **In: Cong. Lat. Am. Quim. Cosmet.**, Motivideu, Uruguai, out., 1993, p.9-8.
- 78-POTARD, G., LAGEL, C., BAILLET, A., SCHAEFER, H., MARTY, J.P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies. **Int. J. Pharmac.**, v.189, n.2, p.29-260, 1999.
- 79-PRISTA, L.N., BAHIA, M.G., VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. Porto: Associação Nacional de Farmácia. 1992, v.1, p.239-298.

- 80-QUIROGA, M.I., GUILLOT, C.F. **Cosmética dermatológica prática** 5.ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1987. p.5-8, 15-19, 42-48, 238-244.
- 81-RASTOGI, S.C., JENSEN, G.H. Identificaton of UV filters in sunscreens products by high-performance liquid chromatography- diode array detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.828, n.1/2, p.311-316, 1998.
- 82- REBELO, M.L. Protetores solares, ação das radiações solares na pele. Filtros químicos e físicos. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa, v.47, n.2, p.61-69, 1997.
- 83-RIBEIRO, C. Sol e câncer de pele. **Rev. Racine**, São Paulo, v.51, ano IX, p.37-38, 1999.
- 84-RIEGER, M.M. Photostability of cosmetic ingredients on the skin. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v. 112, p.65-72, 1997.
- 85-ROPE, D.M. Sunscreens regulations – changes coming. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.163, n.4-6, p.10-13, 1998.
- 86-SAMPAIO, C. Bloqueadores solares de amplo espectro substituem produtos com FPS superior a 30. **Rev. Cosm. Med. Estet.** São Paulo, v.4, n.3, p.6-7, 1996.
- 87-SAX, B.W. Educating consumers about sun protection. **Pharmacy Times**, v.66, n.5, p.48 e 50, 2000.
- 88-SAYRE, R.M., AGIN, P.P., LEVEE, G.J., MARLOWE, E. Comparison of in vivo and in vitro testing of suncreening formulas. **Photochem. Photobiol.**, Oxford, v.29, n.3, p.559-556, 1979.

- 89- SCALIA, S. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography. **J. Cromatogr. A**, Amsterdam, v. 870, n.1-2, p.199-205, 2000.
- 90-SCHRADER, K. A mensuração do fator de proteção solar segundo o ponto de vista europeu. In: XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos. **Aerosol Cosmet.**, 1995. São Paulo, p. 64-68.
- 91-SCHULZE, R. Einige versuche und bemerkungen zun problem der handelsublichen lichtschutzmittel. **Parf. U. Kosm.**, v.37, p.310-315, 1956.
- 92-SHAATH, N.A. Analysis of sunscreens chemicals. Separation and identification techniques. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.104, n.11, p.75-85, 1989.
- 93-SHAATH, N. A. Evaluation of modern sunscreens chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAAT, N.A. eds **Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects**. New York: Marcel Dekker, 1990, p.3-35. (Cosmet. Science Technology series).
- 94-SHAATH, N.A. The analysis of sunscreen chemical. Part 1. Quality control procedures for sunscreen chemicals. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.102, n.3, p.69-81, 1987.
- 95-SHAAT, N.A. The chemistry of sunscreens. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.101, p.55-62, 64, 67-70, 1986.

- 96-SHAATH, N.A. On the theory of ultraviolet absorption by sunscreen chemicals. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.82, n.5/6, p.193-207, 1987.
- 97-SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.203-223.
- 98-SKOOOG, DOUGLAS, A. **Fundamentals of analytical chemistry**, 6.ed. Fort Worth: Saunders College, 1992. p.300-306, 329-344, 674-683, 725-750.
- 99-SLEIGHT, R.B. Reverser-phase chromatography of some aromatic hydrocarbons. Structur-retention relationships. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.83, p. 31-38, 1973.
- 100- SNYDER, L.R., KIRLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2ªed. New York: John Wiley., 1997, 765p.
- 101- STEINER, D. Câncer de pele. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.9, n.5, p.26-27, 1997.
- 102- STEINER, D. Benefícios e riscos da exposição solar. **Rev.Racine**, São Paulo, v.41, n.11/12; 1, p.4-9, 1997/1998.
- 103- STEINER, D. Envelhecimento cutâneo. **Cosmet. Toiletries ed. Port.**, São Paulo, v.9, n.3/4, p.30-33, 1997.
- 104- STEINER, D. A cosmecêutica e a dermatologia. **Cosmet. Toiletries ed. Port**, São Paulo, v.7, n.11/12, p.28-29, 1996.

- 105- STOCKDALE, M. Filtros solares UVA: Métodos para avaliação de sua eficácia. **Cosmet. Toiletries ed. Port**, São Paulo, v.3, n.2/3, p.26-30, 1991.
- 106- STEINBERG, D. C. New twists in international regulations for tanning products. **Phorma Cosmet.**, São Paulo, n.10, 1997. 5p.
- 107- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharm. Thecnol.**, p.12-20, 1998.
- 108- TAN, H.S.I., SIH, R., MOSELEY, S.E., LICHTIN, L.J. Assay of mixtures of padimate- O and oxybenzone in sunscreen formulations by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.291, p.275-282, 1984.
- 109- THOMPSON, S.C.; JOLLEY, D., and MARKS, R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreens use. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1147-1151, 1993.
- 110- UNITED States pharmacopeia, 24^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999.
- 111- URBACH, F. Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. **J. Photochem. Photobiol. B Biology**, v.40, p.3-7, 1997.
- 112- VANQUERP, V., RODRIGUEZ, C., COIFFARD, L.J.M., COIFFARD, C., DE ROECK-HOLTZHAUER, Y. High-performance liquid chromatographic method for the coparison of the photostability of five sunscreen agents. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.832, n.1-2, p.273-277, 1999.

- 113- VELAZQUEZ, M.D.C. As soluções seguras e efetivas para a proteção UV. **Rev. Racine**, São Paulo, n.1/2, p.40-45. 1997.
- 114- VIGLIOGLIA, P.A., RUBIN, J. **Cosmiatria II**. 2.ed., Buenos Aires, AP. Americana, 1991. p.120-135.
- 115- WALTERS, C., KEENEY,A., WIGAL C.T., JOHNSTOM C.R., CORNELIUS, R.D. The spectrophotometric analysis and modeling of sunscreens. **J. Chem. Educ.** v.74, n.1, p.99-102, 1997.
- 116- WILKINSON, J.B., MOORE, R.J. **Cosmetologia de Harry**. Madri: Diaz de Santos, 1990. p.249-288; 747-779; 807-837.
- 117- ZORETTO, N. L. **Atlas de anatomia humana**. São Paulo: IBEP, 1987. p.169.